

痤瘡患者由来 *Propionibacterium acnes* の

抗菌薬耐性機構に関する研究

平成 29 年度

中瀬 恵亮



## 痤瘡患者由来 *Propionibacterium acnes* の抗菌薬耐性機構に関する研究

研究分野      薬物治療学  
紹介教授      野口 雅久  
学位申請者    中瀬 恵亮

*Propionibacterium acnes* は、ヒトの上半身に広く定着している常在菌であり、好脂性の嫌気性菌である。近年では、身体各所における様々な日和見感染の原因の1つとして分離され、臨床上的重要性は増している。*P. acnes* は一般的にニキビと呼ばれる痤瘡の増悪因子として知られている。痤瘡は、思春期に顔面や体幹部に発症し、患者に精神的ストレスを与え、瘢痕形成は更なるストレスの原因となる。つまり、痤瘡は致命的な疾患ではないが、その治療の重要性は非常に大きい。痤瘡の重症例は欧米で多く認められていたが、日本でも増加傾向にあり、食事の欧米化や生活習慣の乱れなどが関連していると考えられている。

痤瘡に対しては古くから薬物治療が行われており、増悪因子である *P. acnes* の除菌を目的として抗菌薬が使用されている。本邦では、2008年に初めて、日本皮膚科学会により治療法の標準として痤瘡治療ガイドラインが示されたが、それ以前は内服と外用抗菌薬を中心とした経験的治療が行われていた。現在、外用抗菌薬は、リンコマイシン系の clindamycin およびキノロン系の nadifloxacin、ozenoxacin が適応となっている。中等症以上の患者には、しばしば経口薬も使用され、テトラサイクリン系の doxycycline、minocycline、マクロライド系の roxithromycin、フルオロキノロン系の levofloxacin、β-ラクタム系の faropenem など様々な抗菌薬が使用されている。近年、抗菌薬の繁用により世界中で様々な抗菌薬に耐性を示す *P. acnes* が出現し、痤瘡治療を困難にしている。ところが、本邦における痤瘡患者由来 *P. acnes* の薬剤感受性等の情報は非常に少ないのが現状である。本研究は、痤瘡治療における抗菌薬の適正使用に貢献することを目的として、痤瘡患者から分離された *P. acnes* の薬剤感受性を調査し、さらに、薬剤耐性菌の耐性機構および出現メカニズムについて解析した。

### 第1章 痤瘡患者由来 *P. acnes* の薬剤感受性調査

2008年から2011年に、皮膚科クリニックおよび大学病院の専門外来を受診した痤瘡患者から分離した191株の *P. acnes* について薬剤感受性を調査した。その結果、クリニックにおけるマクロライド耐性率は、2008年に27.6%と高い割合を示したが、2009年以降は5%前後を推移していた (Fig. 1)。2008年の高い分離率は、大学病院を受診していた患者が、クリニックを受診したことが原因と示唆された。そこで、大学病院の外来患者で薬剤感受性を調査したところ、23.2%と高いマクロライド耐性率を示した。大学病院は、治療に難渋している患者が多く受診するため、クリニックより高い耐性率を示したと考えられる。そこで、抗菌薬使用歴について解析すると、マク

ロライド耐性株分離患者 (81.3%) は、感受性株分離患者 (31.9%) に比べ、有意にマクロライド使用歴を有する者が多かった ( $P < 0.001$ )。他にも、テトラサイクリン系薬とキノロン系薬に耐性を示す *P. acnes* を日本で初めて分離した。また、耐性因子について解析すると、clindamycin の高度耐性に寄与する 23S rRNA メチル化酵素をコードする *erm(X)* 保有株、16S rRNA 遺伝子の G1036C 変異を有するテトラサイクリン耐性株を日本で初めて分離した。以上の結果は、本邦の痤瘡患者が様々な薬剤耐性 *P. acnes* を保菌していることを明らかにし、痤瘡患者における抗菌薬使用と耐性株保有が関連していることを示した。

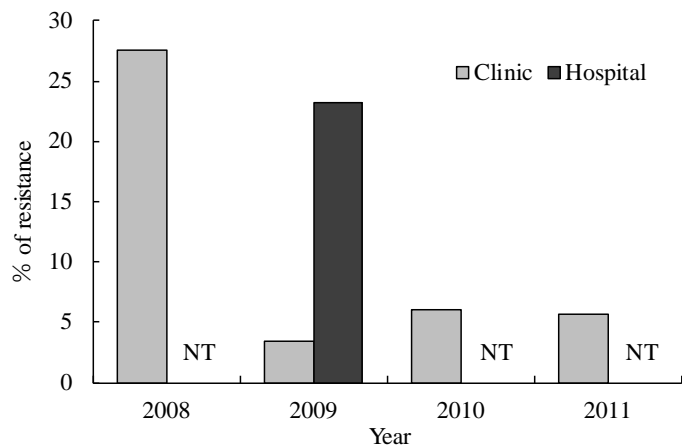


Fig. 1. Annual distribution of macrolide-resistant *P. acnes* from acne patients examined in clinic and hospital. NT, not tested

## 第2章 *P. acnes* におけるテトラサイクリン段階的耐性機構の解析

痤瘡治療において、内服テトラサイクリン系薬の minocycline、doxycycline は、組織移行性の良さから多くの国や地域で使用されている。第1章では、痤瘡患者より、テトラサイクリン系薬に低感受性および耐性を示す *P. acnes* 株を分離した。痤瘡治療の標準内服量とされる doxycycline を 100 mg/day で内服すると、血中濃度は約 1.5  $\mu\text{g/ml}$  であると報告され、毛包内ではさらに低いことが推測される。そのため、doxycycline の MIC が 1 ~ 2  $\mu\text{g/ml}$  の低感受性を示す *P. acnes* 株に対しては十分な抗菌作用を示さない可能性がある。そこで、本章では、*P. acnes* におけるテトラサイクリン低感受性および耐性化機構について研究した。

痤瘡患者から分離された doxycycline 耐性株 (MIC = 16  $\mu\text{g/ml}$ ) および低感受性株 (MIC = 1 ~ 2  $\mu\text{g/ml}$ ) に対して、16S rRNA 遺伝子と ribosomal S3 protein 遺伝子 *rpsC*、S10 protein 遺伝子 *rpsJ* の塩基配列を解析した (Table 1)。その結果、耐性株から既知の耐性因子である 16S rRNA における G1036C 変異が認められた。*rpsJ* を解析すると、耐性と低感受性株で 5 種の変異が認められ、これらの変異はコードされる S10 protein の 57、58 番における 4 種のアミノ酸置換を生じさせた。一方、S3 protein をコードする *rpsC* に、全ての株で変異は認められなかった。そこで、16S rRNA 遺伝子変異および S10 protein のアミノ酸置換のテトラサイクリン耐性への関与を確認するために、*in vitro* で耐性変異株の作製を行った (Table 1)。その結果、doxycycline に対して MIC が 4  $\mu\text{g/ml}$  を示す低度耐性変異株が得られ、それらは臨床株と同様の 4 種の S10 protein アミノ酸置換を起こす *rpsJ* の遺伝子変異を有していた。しかし、16S rRNA および *rpsC* に変異は認められなかった。以上より、S10 protein の 57 と

58 番におけるアミノ酸置換が *P. acnes* のテトラサイクリン低感受性化に関与することを明らかにした。さらに、*P. acnes* は、S10 protein アミノ酸置換により低感受性化し、加えて 16S rRNA 変異を持つことで段階的に耐性化することが示唆された。

Table 1. Tetracycline resistance profiles of clinical isolates and resistant mutants of *P. acnes*

Strain	MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )			Mutations of tetracycline resistance factors	
	Doxycycline	Minocycline	Tigecycline	16S rRNA	S10 protein
Clinical isolate					
9	16	8	2	G1036C, A1180C	Tyr58Asp
11	16	8	2	G1036C, A1180C	Tyr58Asp
15b	1	0.25	0.5	Wild	Lys57Glu, Tyr58Asp
34b	16	8	2	G1036C, A1180C	Tyr58Asp
45	1	1	0.25	Wild	Lys57Asn
75b	1	0.25	0.25	Wild	Lys57Asn
77b	2	1	0.5	Wild	Lys57Met
83b	2	1	0.5	Wild	Lys57Met
85b	1	0.5	0.5	Wild	Lys57Met
Laboratory strain					
1-1	4	2	0.5	Wild	Lys57Glu
1-2	4	2	0.25	Wild	Tyr58Asp
2-2	4	2	0.5	Wild	Lys57Met
ATCC11828	0.13	$\leq 0.06$	$\leq 0.06$	Wild	Wild

ATCC11828 was the parental strain.  $\leq$ , or less

### 第3章 *P. acnes* におけるキノロン耐性機構の解析

世界と比較して、本邦では痤瘡治療におけるキノロン系薬の処方頻度が著しく高い。第1章における研究で、キノロン耐性 *P. acnes* を本邦で初めて分離した。キノロン系薬の多用は、さらなる耐性菌の増加を招く恐れがある。そこで、本章では痤瘡患者から分離された *P. acnes* のキノロン感受性を解析した。加えて、耐性機構を解明するために、*in vitro* で耐性変異株を作製し、解析を行った。

痤瘡患者由来 280 株の *P. acnes* について薬剤感受性を調査した結果、levofloxacin の MIC が 8 ~ 16  $\mu\text{g/ml}$  を示すキノロン低感受性株が 8 株 (2.9%) 認められた。耐性因子を特定するために、キノロン系薬の標的部位である DNA gyrase 遺伝子 (*gyrA* and *gyrB*) および DNA topoisomerase IV 遺伝子 (*parC* and *parE*) の塩基配列を解析した。その結果、DNA gyrase を構成するサブユニット GyrA にアミノ酸置換 (Ser101Leu または Asp105Gly) を起こす変異が認められた。そこで、標的部位変異のキノロン耐性への関与を確認するために、耐性変異株の作製を行った (Table 2)。その結果、内服で使用する ciprofloxacin と levofloxacin からは痤瘡患者由来株と同じアミノ酸置換を有する耐性変異株が得られた。一方、外用薬である nadifloxacin からは、痤瘡患者から見出されていない GyrA の Ser101Trp を有する耐性変異株が得られた。また、更なる耐性変異株の分離を行うと、GyrA に 2 つのアミノ酸置換、または GyrA と GyrB に 1 つずつのアミノ酸置換を有する耐性変異株が得られた。一方、DNA topoisomerase IV 遺伝子には変異は認められなかった。以上の結果から、*P. acnes* は他のグラム陽性菌と異なり、キノロン系薬の DNA gyrase への選択性が高く、薬剤によって異なるアミノ酸置換を生じる遺伝子変異を起こすことが示された。各キノロン系薬における耐性変異

株出現頻度を測定すると、ciprofloxacin および levofloxacin は nadifloxacin よりも高い耐性変異株出現頻度を示した。耐性変異株の増殖能を比較したところ、nadifloxacin の選択で得られた耐性変異株の増殖能が、最も低かった。以上の結果は、*P. acnes* のキノロン耐性化には、内服薬の levofloxacin の服用が大きく関与し、外用薬の nadifloxacin による耐性変異株は出現しにくいことを強く示唆した。

Table 2. Quinolone susceptibilities and mutations of quinolone-resistant strains

Resistant mutant*	MIC (μg/ml)				DNA gyrase substitutions	
	Ciprofloxacin	Levofloxacin	Nadifloxacin	Ozenoxacin	GyrA	GyrB
1st selection						
CPFX4-1	16	16	8	0.5	Ser101Leu	-
CPFX4-8	16	4	1	0.13	Asp105Gly	-
LVFX4-1	16	16	8	0.5	Ser101Leu	-
NDFX8-1	16	32	8	0.5	Ser101Trp	-
2nd selection						
FQ-R1	16	64	32	4	Ser101Leu, Asp105Gly	-
FQ-R2	16	64	16	1	Ser101Leu	Asp476Glu
FQ-R3	16	64	32	4	Ser101Leu	Ser495Pro
FQ-R4	16	64	32	4	Ser101Leu, Asp105Gly	-
ATCC11828	0.5	0.25	0.25	≤0.06	-	-

\*, Strain no. exhibit the antimicrobial using the selection of resistant mutants. Strains named CPFX were selected by ciprofloxacin. In similar, strains named LVFX and NDFX were selected by levofloxacin and nadifloxacin, respectively. FQ-R1, R2, and R3 were selected by levofloxacin from LVFX4-1 as a parental strain. In the same way, FQ-R4 was selected by levofloxacin from CPFX4-8. -, no substitution was found.

## 総括

本研究では、日本における痤瘡患者由来 *P. acnes* の薬剤感受性状況を調査し、薬剤耐性 *P. acnes* が増加していることを明らかにした。さらに、分離された耐性菌の各種抗菌薬耐性機構および耐性菌出現機構を明らかにし、*P. acnes* におけるテトラサイクリン系およびキノロン系薬の耐性化には、内服薬が関与していることが示された。薬剤耐性 *P. acnes* の増加は、抗菌薬による除菌効果を低下させ、痤瘡治療を長期化させる原因となりうる。本研究結果から、耐性菌を出現・流行させないためには、痤瘡患部に高濃度で曝露できない内服抗菌薬の単剤治療は避け、外用抗菌薬や殺菌作用のある benzoyl peroxide を併用するべきであると考察される。また、使用方法が遵守できなければ、外用抗菌薬であっても耐性化に関与する恐れがあることから、内服薬・外用薬問わず、患者への指導を十分に行うことが、*P. acnes* の耐性化防止および有効な治療を行うために最も重要であると考ええる。本研究は、耐性菌を増加させない痤瘡治療における抗菌薬の適切な選択を行う一助となる情報を示しており、医師、薬剤師だけでなく、患者も含めた抗菌薬の適正使用に大きく貢献すると考える。

## 【研究結果の掲載】

1. *J Dermatol*, **39**, 794-6 (2012)
2. *J Med Microbiol*, **63**, 721-8 (2014)
3. *J Glob Antimicrob Resist*, **6**, 160-161 (2016)
4. *Chemotherapy*, **62**, 94-99 (2016)
5. *J Med Microbiol*, **66**, 8-12 (2017)
6. *Anaerobe*, **42**, 166-171 (2016)

# 【 目 次 】

序論	1
第1章：痤瘡患者由来 <i>P. acnes</i> の薬剤感受性調査	8
緒言	9
方法	10
1. 使用菌株	10
2. <i>P. acnes</i> の分離および培養	10
3. 薬剤感受性の測定	10
4. 使用薬剤	11
5. 染色体の抽出	12
6. 薬剤耐性遺伝子 <i>erm(X)</i> の検出	12
7. 16S rRNA および 23S rRNA 遺伝子の塩基配列解析	13
8. <i>P. acnes</i> の遺伝学的分類法による解析	13
9. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE)	15
10. 耐性変異株出現頻度の測定	15
11. 統計学的解析	16
12. 倫理的配慮	16
結果	17
1. クリニック由来 <i>P. acnes</i> 株の調査	17
1-1. 薬剤感受性	17
1-2. MLS <sub>B</sub> 耐性因子の解析	17
1-3. テトラサイクリン耐性因子の解析	17
2. 大学病院由来 <i>P. acnes</i> 株の調査	20
2-1. 薬剤感受性	20
2-2. MLS <sub>B</sub> 耐性因子の解析	20
2-3. テトラサイクリン耐性因子の解析	20
2-4. PFGE による近縁性解析および遺伝型解析	23
2-5. 痤瘡患者の重症度と薬剤使用歴	23
3. 各種抗菌薬の耐性株出現阻止濃度の測定	27
考察	29

第2章： <i>P. acnes</i> におけるテトラサイクリン段階的耐性機構の解析	・ ・ ・ ・ 31
緒言	・ ・ ・ ・ 32
方法	・ ・ ・ ・ 34
1. 使用菌株	・ ・ ・ ・ 34
2. <i>P. acnes</i> の遺伝学的分類法による解析	・ ・ ・ ・ 34
3. 薬剤感受性の測定	・ ・ ・ ・ 34
4. テトラサイクリン耐性因子の解析	・ ・ ・ ・ 34
5. テトラサイクリン耐性変異株の作成	・ ・ ・ ・ 34
結果	・ ・ ・ ・ 36
1. 痤瘡患者由来株のテトラサイクリン感受性	・ ・ ・ ・ 36
2. 患者背景	・ ・ ・ ・ 37
3. 痤瘡患者由来株のテトラサイクリン耐性因子の解析	・ ・ ・ ・ 37
4. テトラサイクリン耐性変異株の作成	・ ・ ・ ・ 39
考察	・ ・ ・ ・ 40
第3章： <i>P. acnes</i> におけるキノロン耐性機構の解析	・ ・ ・ ・ 43
緒言	・ ・ ・ ・ 44
方法	・ ・ ・ ・ 45
1. 使用菌株	・ ・ ・ ・ 45
2. <i>P. acnes</i> の遺伝学的分類法による解析	・ ・ ・ ・ 45
3. 薬剤感受性の測定	・ ・ ・ ・ 45
4. 痤瘡患者由来株のキノロン耐性因子の解析	・ ・ ・ ・ 45
5. キノロン耐性変異株の作成	・ ・ ・ ・ 46
6. 耐性変異による増殖への影響解析	・ ・ ・ ・ 46
結果	・ ・ ・ ・ 47
1. 痤瘡患者由来株のキノロン感受性および耐性因子の解析	・ ・ 47
2. キノロン耐性変異株の作成	・ ・ ・ ・ 47
3. 各種キノロン系薬における耐性変異株出現頻度	・ ・ ・ ・ 51
4. キノロン耐性変異による増殖への影響	・ ・ ・ ・ 51
考察	・ ・ ・ ・ 54
総括	・ ・ ・ ・ 56
謝辞	・ ・ ・ ・ 57
参考文献	・ ・ ・ ・ 58



## 【 略語一覽 】

BA: brucella agar containing 5% lysed defibrinated sheep blood

BB: brucella broth containing 5% lysed defibrinated horse blood

CFU: colony forming unit

CLSI: clinical and laboratory standards institute

EDTA: ethylene diamine tetraacetic acid

EGTA: ethylene glycol tetraacetic acid

IL-8: interleukin-8

PCR: polymerase chain reaction

PFGE: pulsed-field gel electrophoresis

PMQR: plasmid-mediated quinolones resistance

MIC: minimum inhibitory concentration

MPC: mutant prevention concentration

MLS<sub>B</sub>: Macrolides-Lincosamides-Streptogramin B

MLST: multilocus sequence typing

MRSA: methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*

MSW: mutant selection window

O. D.: optical density

QOL: quality of life

QRDR: quinolone-resistance-determining region

SLST: single-locus sequence typing

TNF- $\alpha$ : tumor necrosis factor- $\alpha$

TSA: tryptone soya agar

TSB: tryptone soya broth

$\leq$ : or less

$\geq$ : or more



## 【 序 論 】

*Propionibacterium acnes*は、和名でアクネ菌と呼ばれ、*Propionibacterium*属に分類される細菌である。その大きさは、およそ $0.5 \sim 0.8 \times 1.0 \sim 5.0 \mu\text{m}$ で、グラム陽性の耐酸素性嫌気性桿菌である<sup>1)</sup>。*P. acnes* は、1896年にUnnaによってacne bacillus (痤瘡桿菌)として初めて医学雑誌に報告され、1897年にはSabouraud が痤瘡からの分離および純培養に成功した<sup>2)</sup>。*P. acnes* は、ヒトの上半身に広く定着している常在菌で、 $10^2 \sim 10^6$  colony forming unit (CFU)/ $\text{cm}^2$ の菌量が皮膚に存在しているといわれており、皮膚常在菌の約半数を占めると報告されている<sup>3,4)</sup>。同属である*P. avidum*および*P. granulosum*も皮膚に常在しているが、少数である。*P. freudenreichii* のように乳酸発酵を行う菌種は、チーズの製造に利用されている<sup>5)</sup>。最近では、*P. acnes*と遺伝学的に非常に近縁である*P. humerusii*も皮膚から見出されている<sup>6)</sup>。*P. acnes*と表皮ブドウ球菌*Staphylococcus epidermidis*とで皮膚細菌叢の大半を占め、皮膚表層における脂肪酸などの代謝産物による皮膚の湿潤性の維持、pH調整の役割を担っている<sup>7)</sup>。*P. acnes* は、皮脂を好むため、皮膚上でもエクリン腺付近や粘膜領域に多く認められ、痤瘡の増悪因子として世間でも広く知られている<sup>8)</sup>。その他にも眼科領域や整形外科・形成外科領域における医療器具感染、前立腺がんへの関与やsarcoidosisの発症に関与することが明らかになってきている<sup>9-13)</sup>。

*P. acnes* は、その病原性や表現型を特徴付けるために様々な方法で分類が行われてきた<sup>14)</sup>。1970年にVossらによって、糖やその他の化合物の代謝能を利用した分類法<sup>15)</sup>が報告されたのに始まり、1973年には抗血清を利用した分類<sup>16)</sup> が、1978年にはbacteriophageを利用した分類法<sup>17)</sup> が報告された。さらに、分子生物学の発展とともに、DNA解析による分子遺伝学的な分類法が主流となっている。McDowellらによって、hemolysinをコードする*tly*およびrecombinase Aをコードする*recA*遺伝子配列を利用したsingle-locus analysisが報告され、広く使用されている<sup>18,19)</sup>。本法は、当初、DNAシーケンスを用い、type I および II の遺伝型に分類していたが、現在ではさらに細分化され<sup>20)</sup>、またpolymerase chain reaction (PCR) により簡易的に決定する方法も見出されている<sup>21)</sup>。最近では、multilocus sequence typing (MLST) が細菌種の遺伝学的分類に多用されている。*P. acnes*でもMLSTは使用されているが、解析する遺伝子と遺伝子数が異なるMLST<sub>8</sub><sup>19,22)</sup>、MLST<sub>9</sub><sup>23)</sup>、MLST<sub>4</sub><sup>24)</sup>が存在するため、活用しきれていないのが現状である。また、MLSTと同等の解析深度をもつsingle-locus sequence typing (SLST) による単遺伝子解析も開発され<sup>25)</sup>、この手法はMLSTよりも短時間で行うことができる

ため、大規模調査に適している。最近では、次世代シーケンサーの普及により、全ゲノム解析も行われているが、情報量が過多であるため、菌株間の比較解析には不向きである<sup>26,27)</sup>。これらの解析法を活用することで、病原性などの菌株の特徴は少しずつ明らかとなっているが、その特定には至っていない。

常在菌である*P. acnes* は、一般的には無害であると考えられていたが、近年になり身体の各所における様々な日和見感染の原因となることが知られ、臨床上的重要性は増している<sup>28-33)</sup>。中でも、痤瘡の増悪因子としては古くから知られており、*P. acnes* の病原性が研究されているが、その増悪機構は不明である。

痤瘡は、一般にはニキビとして広く知られている疾患である。主に性ホルモン分泌の高まりにより、皮脂腺の発達する12～25歳で約80%が発症する<sup>34)</sup>。欧米とは異なり、日本では重症例は少ないと考えられていたが、食事の欧米化やストレスなどの生活習慣の変化から重症例が増加している<sup>35)</sup>。痤瘡の重症度は国や地域ごとに診断基準があり、日本では日本皮膚科学会において痤瘡重症度判定基準に基づき、皮疹数により軽症から最重症の5段階で診断されている (Table 1)<sup>36)</sup>。皮疹の個数だけでなく、痤瘡は穏やかな面皰 (毛包に皮脂や角質が詰まっている状態) や炎症性皮疹、結節など病態も異なる。痤瘡は、顔面、胸背部などの毛包・脂腺系が多く認められる部位で好発する疾患であり、脂質代謝異常 (内分泌的因子)、角化異常、細菌の増殖などの様々な要因が複雑に関与する炎症性疾患である<sup>37-40)</sup>。痤瘡の炎症化膿部からは、皮膚の常在菌である*P. acnes* や*S. epidermidis*が分離され、痤瘡の悪化に関与していると考えられている<sup>41,42)</sup>。

Table 1. Classification of acne severity in Japan <sup>36)</sup>

Acne severity	No. of papules and pustules per half face
Mild	≤5
Moderate	6 ~ 20
Severe	21 ~ 50
Very severe	≥51

*P. acnes*の病原性として、以下のメカニズムが挙げられる。一つに、過剰に増殖した*P. acnes*は、好中球や表皮細胞に働きかけ、interleukin-8 (IL-8) やtumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) などの炎症性サイトカインの産生を誘導し、炎症を惹起させることが知られている<sup>43,44)</sup>。*P. acnes*は、proteaseやhyaluronidaseなど細胞機能に影響を及ぼす種々の酵素を産生誘導するが、痤瘡においては細菌性外分泌lipaseによる皮脂

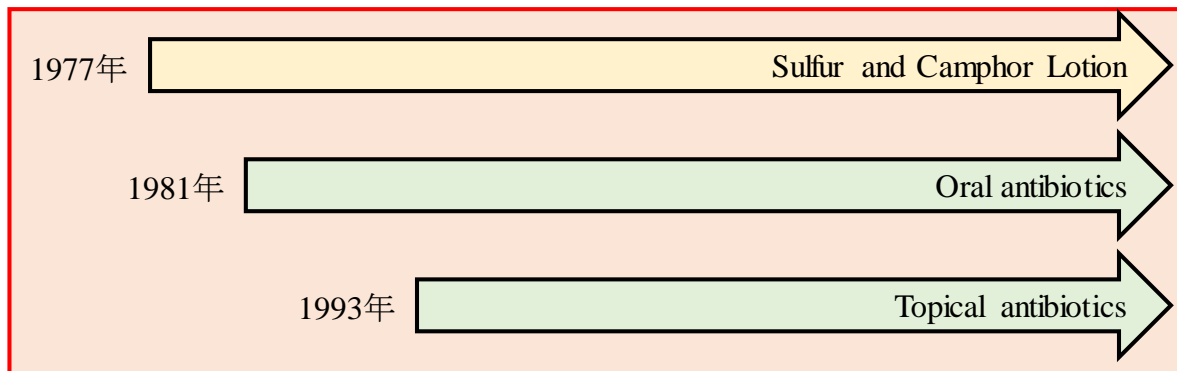
の分解に大きく関与する<sup>45,46)</sup>。*P. acnes*のlipaseは、皮脂の主成分であるtriglycerideを脂肪酸とglycerol に分解する。生成された脂肪酸は、痤瘡病巣部への好中球の遊走を促し、炎症を生じさせる<sup>47,48)</sup>。また、*P. acnes*自身もpropionic acidなどの低級脂肪酸を産生するため、炎症悪化に関与すると示唆される。また、*P. acnes* は、炎症反応のみならず、微小面皰 (microcomedo) の形成にも関連すると示唆されている<sup>43,49)</sup>。以上より、*P. acnes*は、microcomedoの形成から痤瘡の炎症反応、さらに癬痕形成といった痤瘡の病態に深く関与している。

思春期に顔面や体幹部に発症する痤瘡は、患者にストレスを増加させる原因となり、quality of life (QOL) を大きく低下させ、痤瘡が重症化するほどストレスも大きくなる<sup>50,51)</sup>。痤瘡悪化により形成された癬痕は、完全に治癒するのに数ヶ月を要することがあり、ストレスは継続する<sup>52)</sup>。つまり、痤瘡は致死的な疾患ではないが、その治療の重要性は非常に大きくなっている。

痤瘡に対しては、古くから薬物による治療が行われている (Fig. 1)。本邦において、2008 年に初めて、日本皮膚科学会により治療法の標準として痤瘡治療ガイドラインが示された<sup>53)</sup>。一方、それ以前は、内服と外用抗菌薬を中心とした経験的治療が行われていた。前述のように、*P. acnes* は痤瘡の増悪因子となることから、*P. acnes* の除菌目的で抗菌薬が古くから使用されている<sup>54)</sup>。本邦において、痤瘡治療における抗菌薬の使用頻度は高く、外用薬としてリンコマイシン系の clindamycin およびキノロン系の nadifloxacin、ozenoxacin が適応となっている。また、経口薬として、テトラサイクリン系の doxycycline、minocycline、マクロライド系の roxithromycin、キノロン系の levofloxacin、β-ラクタム系の faropenem など様々な抗菌薬が使用されている。2016 年に改訂された痤瘡治療ガイドラインでは、急性炎症期には benzoyl peroxide 外用薬と clindamycin 外用薬の併用、または adapalene 外用薬と外用または内服抗菌薬の併用が推奨されている<sup>37)</sup>。現在では、患者の症状・重症度に応じて薬物療法だけでなく美容皮膚科学的治療なども施行されている。Adapalene は表皮の角化抑制や抗炎症作用を示し、benzoyl peroxide は角質溶解作用に加えて殺菌作用を示し、両者とも抗菌薬と併用することで高い治療効果を示すことが報告されている<sup>55,56)</sup>。

近年、世界中で様々な抗菌薬に耐性を示す *P. acnes* が出現し、痤瘡治療に影響を与えている (Table 2)。特に、マクロライド系薬は抗菌活性を示すだけではなく、抗菌活性と関連性のない直接的な抗炎症作用も示すことから、欧米では、1980 年代からマクロライド系の erythromycin 外用薬が汎用されている<sup>54)</sup>。その結果、マクロライド系薬に対して耐性を示す *P. acnes* が検出されるようになり、マクロライド耐性 *P. acnes* は、最近では欧米のみならず、アジアや南米など世界中で分離されるようになった<sup>57)</sup>。

## Treatment of inflammatory acne



## Treatment of non-inflammatory acne

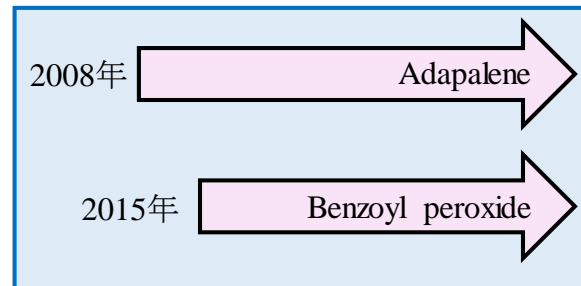


Fig. 1. Transition of medicine for acne treatment in Japan

マクロライド系薬は、細菌の 70S リボソームの 50S サブユニットを構成する 23S rRNA の domain V 領域に位置する 2058 位および 2059 位（大腸菌相当部位）の adenine 残基に結合し、peptidyl transferase を阻害し、静菌作用を示す (Fig. 2)。マクロライド系薬は、リンコマイシン系薬や streptogramin B と標的部位が同じであるため、その耐性菌は交差耐性を示すことが知られている。*P. acnes* においては、Macrolides-Lincosamides-Streptogramin B (MLS<sub>B</sub>) 耐性と呼ばれ、世界中で報告されている<sup>58-60</sup>。

*P. acnes* における MLS<sub>B</sub> 耐性機序として 2 つの因子が知られている。1 つは、erythromycin ribosomal methylase (*erm*) 遺伝子の一種である *erm(X)* の獲得である。*erm(X)* にコードされる rRNA methyl transferase (rRNA methylase) は、薬剤標的部位である 23S rRNA の adenine 残基のアミノ基をジメチル化し、薬剤親和性を低下させる。*erm* 遺伝子はグラム陽性菌および陰性菌の間で広く保有されているが、*P. acnes* での保有は確認されていなかった。しかし、2002 年、*Corynebacterium* 由来と考えられる *erm(X)* 遺伝子を含むトランスポゾン Tn5432 が *P. acnes* で初めて発見された<sup>58, 59</sup>。*erm(X)* は、*P. acnes* の MLS<sub>B</sub> 耐性の中でも最も高度耐性に関与するが、保有率はマクロライド耐性株の 10% 未満に留まっており、その流行は未だ確認されていない<sup>58, 61</sup>。しかし、*erm(X)* を獲得することで、最小発育阻止濃度 minimum inhibitory concentration

Table 2. Distribution of antimicrobial-resistant *P. acnes* in the world

Year*	Region	% of resistance				Reference
		EM	CLDM	TC	DOXY	
2002	UK	94.4	90.3	52.8	-	62)
2003	UK	50.0	50.0	25.0	-	59)
	Spain	90.0	90.0	5.0	-	
	Hungary	45.0	40.0	0	-	
	Greece	75.0	75.0	7.0	-	
	Italy	58.0	58.0	0	-	
	Sweden	45.0	45.0	15.0	-	
2005	Europe	17.1	15.1	2.6	-	39)
2006	Italy	50.5	37.6	2.2	-	63)
2007	Singapore	69.2	50.0	11.5	23.0	64)
2008	Iran	52.0	50.0	35.0	-	65)
2008	Japan	10.4	8.3	0	0	66)
2010	France	75.1	-	9.5	9.5	67)
2010	Mexico	46.0	36.0	14.0	20.0	68)
2012	Korea	30.0	26.7	3.3	6.7	69)
2012	Australia	9.0	-	-	-	70)
2013	Hong Kong	20.9	53.5	16.3	16.3	71)
2013	Egypt	49.0	66.3	18.4	6.1	72)
2013	Chile	12.5	7.5	0	0	73)
2013	Colombia	35.0	15.0	8.0	9.0	74)

\*, published year; -, no data.

EM, erythromycin; CLDM, clindamycin; TC, tetracycline; DOXY, doxycycline.

(MIC) が 512 µg/ml 以上の高度耐性を示し、外用の clindamycin による治療を難渋させる可能性があるため、注意しなければならない<sup>58)</sup>。

2 つ目は、23S rRNA 遺伝子の変異である。現在まで、23S rRNA の薬剤結合部位である 2057 位における guanine から adenine への変異 (G2057A)、または 2058 位および 2059 位における adenine から guanine への変異 (A2058G、A2059G) が知られている<sup>75)</sup>。これらの変異によって、薬物の結合親和性が低下し、耐性を引き起こす (Fig. 2)。23S rRNA 変異はその部位によって耐性度が異なることが知られている (Table 3)<sup>58)</sup>。

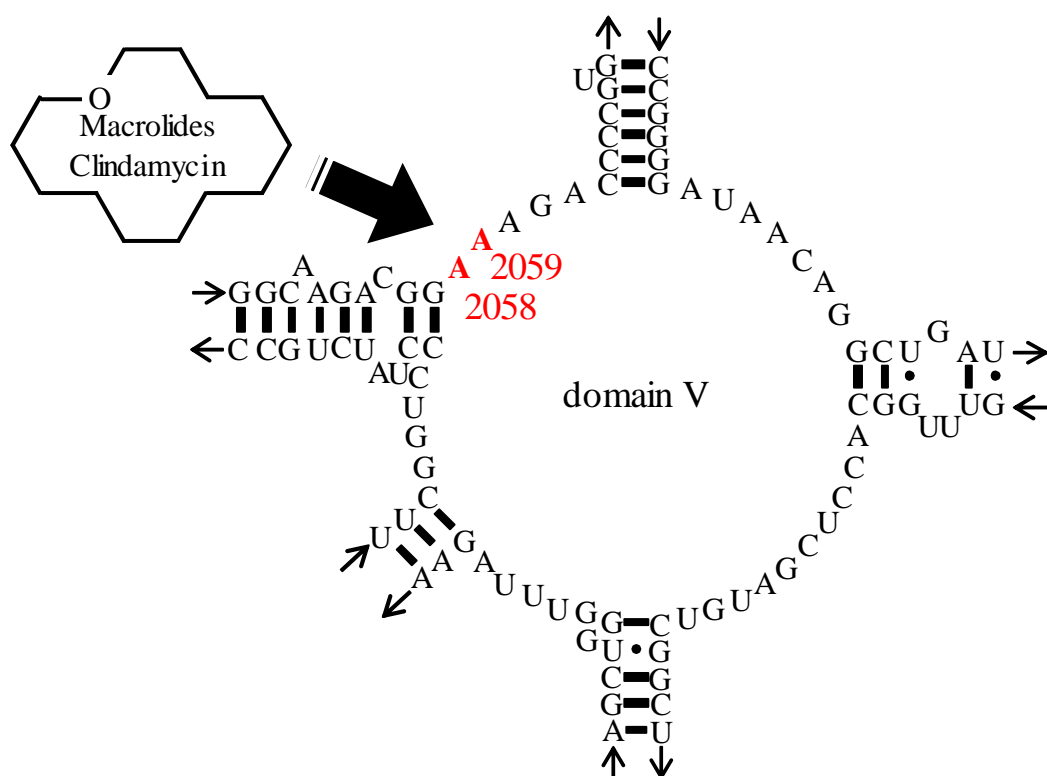


Fig. 2. The secondary structure of the “peptidyltransferase ring” in domain V of *E. coli* 23S rRNA <sup>76)</sup>

Table 3. Phenotypical class of macrolides-lincosamides resistance in *P. acnes*

Phenotypical class	MIC (µg/ml)			23S rRNA mutation / resistance gene
	Erythromycin (14-Macrolides)	Josamycin (16-Macrolides)	Clindamycin (Lincosamides)	
Class I	512 - ≥2048	0.5 - 128	4 - 512	A2058G
Class II	>2048	>512	≥512	<i>erm</i> (X)
Class III	1 - 2	≤0.125	≤0.5	G2057A
Class IV	>2048	≥512	1 - 64	A2059G
Susceptible	≤0.125	≤0.125	≤0.5	none

MIC, minimum inhibitory concentration.



MLS<sub>B</sub> 耐性だけでなく、ヨーロッパを中心にテトラサイクリン耐性 *P. acnes* も流行している<sup>57)</sup>。テトラサイクリン耐性 *P. acnes* は、耐性因子として薬剤標的部位である 16S rRNA の変異を有することが知られており、doxycycline や minocycline などの内服テトラサイクリンの使用が原因と考えられている<sup>77)</sup>。

日本は欧米に比べ、痤瘡治療が遅れていたため、薬剤耐性 *P. acnes* の割合も少なかった。薬剤耐性 *P. acnes* は、痤瘡治療を難渋させるリスク因子になると言われている。本研究では、痤瘡に対してより有効かつ適正な抗菌薬治療を行うために、痤瘡患者から分離される *P. acnes* の薬剤感受性を調査した。また、耐性株の流行を防ぐために、耐性機構および耐性菌出現メカニズムの解析を行った。

第 1 章では、痤瘡に対してより有効性の高い抗菌薬を把握することを目的として、痤瘡患者から分離された *P. acnes* の動向を調査した。また、重症痤瘡患者の受診が多い病院と初診患者の多いクリニックから分離された *P. acnes* の薬剤感受性の比較を行い、患者の重症度による *P. acnes* の薬剤耐性状況を解析した。第 2 章では、テトラサイクリン低感受性 *P. acnes* の増加が認められたことから、低感受性化機構の解析を行った。第 3 章では、世界では非常にまれであるキノロン低感受性 *P. acnes* が日本で分離されたことから、その耐性機構と耐性菌出現機構を研究した。

## 第 1 章

痤瘡患者由来 *P. acnes* の薬剤感受性調査

## 【 緒 言 】

抗菌薬を治療に使用するためには、原因菌に対する薬剤感受性の情報が非常に重要である。そのため、世界中で痤瘡患者由来 *P. acnes* の感受性サーベイランスが行われている。当初は、欧米を中心に薬剤耐性株の流行が認められたが、近年では本邦を含めたアジア、南米でも耐性菌が認められている (Table 2)。日本では、*P. acnes* の感受性調査は 1960 年代に初めて実施され、耐性菌が分離された<sup>78)</sup>。1990 年代以降の本邦における *P. acnes* の薬剤感受性に関して、1995 ~ 1996 年の Kurokawa らの病院における痤瘡患者由来 *P. acnes* の調査により、erythromycin および clindamycin に 4.0%、tetracycline および doxycycline に 2.0%の菌株が耐性を示した<sup>79)</sup>。1996 ~ 1997 年の Nishijima らのクリニックにおける調査では、erythromycin、clindamycin および tetracycline に対して耐性株は認められなかった<sup>41)</sup>。しかし、2006 ~ 2007 年の Ishida らのクリニックにおける調査では、erythromycin に 10.4%、clindamycin に 8.3%の耐性株が認められ、tetracycline に耐性を示す株は認められなかった<sup>66)</sup>。つまり、日本において少数ではあるが薬剤耐性 *P. acnes* が存在していたことが判明した。痤瘡治療先進国と言われるヨーロッパ諸国では、日本に比べ古くから痤瘡治療に抗菌薬を使用していたため、薬剤耐性菌の出現も早く、分離率も高いことが報告されている。日本では、痤瘡治療における抗菌薬使用の歴史は浅く、耐性菌の報告も少ないのが現状である。しかし、ヨーロッパの耐性菌流行状況を考慮すると、今後の耐性菌の増加が危惧される。また、細菌の抗菌薬に対する感受性は、地域や施設によって異なる。そこで本章では、日本の皮膚科クリニックおよび大学病院の専門外来を受診した痤瘡患者由来 *P. acnes* の薬剤感受性を研究した。

## 【 方 法 】

### 1. 使用菌株

菌株は、2008 年から 2011 年に大阪府寝屋川市の西嶋皮ふ科を受診した痤瘡患者 209 名から分離された 143 株の *P. acnes* (2008 年, 29 株; 2009 年, 29 株; 2010 年, 50 株; 2011 年, 35 株)、2009 年から 2010 年に東京都新宿区の東京女子医科大学病院の皮膚科専門外来を受診した痤瘡患者 91 人 (男:女=18:73、平均年齢 25.5 歳) より分離された 69 株の *P. acnes* を使用した。西嶋皮ふ科からは患者情報は得られなかった。薬剤感受性基準株として *P. acnes* ATCC 11828 株、type strain として *P. acnes* ATCC 6919 株を使用した。

### 2. *P. acnes* の分離および培養

痤瘡患者の患部から滅菌綿棒 (Becton Dickinson) により直接採取された検体は、採取後、直ちに輸送容器ケンキポーターII (TERUMO) にて輸送された。綿棒に付着した皮疹内容物を、変法 GAM 寒天培地 (Nissui) の表面に塗布し、35°C、嫌気条件下で 72 hr 培養した。増殖したコロニーを嫌気条件下で変法 GAM 寒天培地、好気条件下で tryptone soya agar (TSA) にて純培養を行った。TSA は tryptone soya broth (TSB: Oxoid) に 1.5% になるように agar bacteriological (Oxoid) を加えて調製した。TSA で増殖せず、変法 GAM 寒天培地でのみ増殖したコロニーを嫌気性菌とした。さらに、分離した菌を Favor G “Nissui” (Nissui) を使用し、グラム染色を行い、グラム陽性桿菌について嫌気性菌同定キット Api 20A (bioMérieux) にて同定を行った。Api web™ (<https://apiweb.biomerieux.com/>) で解析を行い、90% 以上の相同性が得られた株を *P. acnes* とした。菌株は、15% glycerol 水溶液 (Wako) 中に濃厚懸濁し、-80°C 下で保存した。菌株を使用する際は、変法 GAM 寒天培地に塗布し、35°C、嫌気条件下で 72 hr 培養させた。

### 3. 薬剤感受性の測定

薬剤感受性は MIC によって評価し、clinical and laboratory standards institute (CLSI) に準じた agar dilution procedure により測定した<sup>80, 81)</sup>。測定用培地は、5 µg/ml hemin (Alfa Aesar)、1 µg/ml vitamin K<sub>1</sub> (Wako) を添加し、5% 羊溶血血液を含有した brucella agar (BA: Becton Dickinson) を用いた。羊溶血血液の調製は、defibrinated sheep blood (Nippon

Bio-Test Laboratories) を十分溶血が起こるまで、凍結融解を繰り返し、14,000×g で 20 min 遠心分離を行い、上清を羊溶血液とした。菌懸濁用液体培地には、5 µg/ml hemin、1 µg/ml vitamin K<sub>1</sub> を添加し、5% 馬溶血液を含有した brucella broth (BB: Becton Dickinson) を使用した。馬溶血液の調製は、defibrinated horse blood (Nippon Bio-Test Laboratories) を用い、前述と同様の方法で行った。BA で 35°C、72 hr 嫌気条件下で培養した菌を BB に MacFarland standard (bioMérieux) 0.5 と同程度 (約 1.5×10<sup>8</sup> CFU/ml) に懸濁させ、各薬剤を含有した BA にマイクロプランターMIT-P 型 (Sakuma) を用いて接種した。接種後、35°C、48 hr 嫌気条件下で培養を行い、菌の生育を判定した。菌の生育を阻止した薬剤の最小濃度をその菌株に対する MIC (µg/ml) とした。耐性の基準にはブレイクポイント以上の MIC を示した株を耐性とした。抗菌薬のブレイクポイントは、CLSI に準じて定めた (Table 4)<sup>12)</sup>。ブレイクポイントの設定のない薬剤は、本研究室で定めた数値を用いた。Nadifloxacin は外用薬であるため、また、gentamicin は通常、嫌気性菌には使用されないため、ブレイクポイントを設定しなかった。

Table 4. Resistance breakpoint of antimicrobial agents for *P. acnes*

Antimicrobial agent	Breakpoint (µg/ml)	Antimicrobial agent	Breakpoint (µg/ml)
Ampicillin	16	Clarithromycin	2*
Cefaclor	16	Roxithromycin	2*
Cefdinir	64	Spiramycin	8*
Cefditoren	64	Clindamycin	8
Faropenem	16	Doxycycline	16
Ciprofloxacin	8	Minocycline	16
Levofloxacin	8	Gentamicin	ND
Nadifloxacin	ND	Chloramphenicol	32
Erythromycin	2*	Fusidic acid	32

\*, Breakpoints were defined in this study. ND, not determined.

#### 4. 使用薬剤

薬剤感受性の測定には、β-ラクタム系薬の amoxicillin (Sigma-Aldrich)、cefaclor (Sigma-Aldrich)、cefdinir (Astellas)、cefditoren (Meiji Seika Pharma)、faropenem (Maruho)、

キノロン系薬の ciprofloxacin (Wako)、levofloxacin (LKT laboratories)、nadifloxacin (Otsuka)、マクロライド系薬の erythromycin (Sigma-Aldrich)、clarithromycin (Tokyo Chemical Industry)、roxithromycin (Wako)、spiramycin (Sigma-Aldrich)、リンコマイシン系薬の clindamycin (Biochemica)、テトラサイクリン系薬の doxycycline (Sigma-Aldrich)、minocycline (Wako)、アミノグリコシド系薬の gentamicin (Wako)、その他の抗菌薬として chloramphenicol (Wako)、fusidic acid (Sigma-Aldrich) を使用した。

## 5. 染色体の抽出

Microtube 1.5 ml (Bio-Bik) に cell resuspension solution を 120  $\mu$ l 分注後、培養した菌を懸濁し、ミキサーで菌塊がなくなるまで懸濁した。10 mg/ml achromopeptidase (Wako)、10 mg/ml lysozyme (Wako) を 150  $\mu$ l 加え、37°C、20 min 反応させた。その後、2% sodium dodecyl sulfate (Wako) を 150  $\mu$ l 加え、microtube を転倒混和した。等量の phenol/chloroform を加え、5 min ミキサーで懸濁、5 min 平衡化、14,000 rpm、10 min 遠心し、上層を新しい microtube に移した。遠心後の中間層がなくなるまで、phenol/chloroform 抽出を繰り返した。

Microtube に上層を移した後、ethanol 沈殿、洗浄を行った。減圧乾燥により、ethanol を除去した後、ペレットを TE buffer (pH 7.5) 50  $\mu$ l に溶解し、ミキサーで懸濁した。これを染色体 DNA とし、agarose S (Nippon gene) によるアガロースゲル電気泳動にて確認を行った。

## 6. 薬剤耐性遺伝子 *erm*(X) の検出

PCR 0.2 ml tube (Bio-Bik) に、GoTaq<sup>®</sup> green master mix (Promega) 5  $\mu$ l、合成プライマー (Table 5) を各々 10 pmol/0.2  $\mu$ l、PCR 試料 1  $\mu$ l を加え、滅菌超純水で全量を 10  $\mu$ l とした。PCR 試料は、*P. acnes* のコロニーをそれぞれ 100  $\mu$ l に懸濁した菌液を直接用いた。これらをよく混合した後、Veriti Thermal cycler (Thermo Fisher Scientific) で反応を行った。増幅反応は、初期熱変性を 94°C、3 min 行った後、熱変性を 94°C、30 sec、アニーリングを 56°C、30 sec、伸長反応を 72°C、30 sec の行程で 30 サイクル行い、最終伸長反応を 72°C、5 min 行った。DNA 増幅バンドの確認は、反応液を用いて、アガロースゲル電気泳動法により確認した。

## 7. 16S rRNA および 23S rRNA 遺伝子の塩基配列解析

PCR 0.2 ml tube に染色体 DNA 1  $\mu$ l、合成プライマー (Table 5) を各々 10 pmol/0.2  $\mu$ l、Phusion<sup>®</sup> High-Fidelity PCR Master Mix with HF Buffer (New England Biolabs) 10  $\mu$ l を加え、滅菌超純水で全量を 20  $\mu$ l とし、Veriti Thermal cycler で反応を行った。初期変性を 98°C、30 sec で行った後、98°C、10 sec の変性、60°C、30 sec のアニーリング、72°C、45 sec の伸長反応を 30 サイクル行った。DNA 増幅バンドの確認は、アガロースゲル電気泳動法で行った。PCR 産物の精製は、Wizard<sup>®</sup>SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) を用いて行った。精製した PCR 産物は、BigDye<sup>®</sup> Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific) を用いて、ジデオキシターミネーター法によりシーケンス反応を行った。データ解析は、DNA Sequencing Analysis ソフトウェア Version 5.1 (Thermo Fisher Scientific)、AutoAssembler<sup>™</sup> Software Version 2.1 (Thermo Fisher Scientific)、DNA 解析プログラム GENETYX Ver.10.1.5 (Genetyx) を用いて、標的遺伝子の塩基配列を解析した。

## 8. *P. acnes* の遺伝学的分類法による解析

*P. acnes* の遺伝学的分類は、Scholz らによって報告された Single-locus sequence typing (SLST)<sup>25)</sup>、および Lomholt らが報告した 9 つの house keeping gene の配列によって決定する Multilocus sequence typing 9 (MLST<sub>9</sub>)<sup>82)</sup> を使用した。PCR 0.2 ml tube に染色体 DNA 1  $\mu$ l、合成プライマー (Table 5) を各々 10 pmol/0.2  $\mu$ l、Phusion<sup>®</sup> High-Fidelity PCR Master Mix with HF Buffer 10  $\mu$ l を加え、滅菌超純水で全量を 20  $\mu$ l とした。初期変性を 98°C、30 sec で行った後、98°C、10 sec の変性、60°C、20 sec のアニーリング、72°C、20 sec の伸長反応を 30 サイクル行った。DNA 増幅バンドの確認は、アガロースゲル電気泳動法で行った。PCR 産物の精製後、DNA シーケンスを行った。塩基配列の解析は SLST for *Propionibacterium acnes* (<http://medbac.dk/sl原因st/pacnes>) で行った。

Table 5. Oligonucleotide primers used in this study

Primer	Oligonucleotide (5' to 3')	T <sub>m</sub> (°C)	Product size (bp) <sup>b</sup>	Reference
<i>erm</i> (X)_I-F	CTCACCAACCACAAGATCATC	62.0	710	66)
<i>erm</i> (X)_I-R	GAAGAGATCGATCCAGTCGTT	62.1		
<i>E. coli</i> -23S_F	AGTCGGGACCTAAGGCGAG	58.0	1551	66)
<i>E. coli</i> -23S_R	TTCCCGCTTAGATGCTTTCAG	58.2		
<i>acnes</i> 23S_sequence-F <sup>a</sup>	CGATGTATACGGACTGACTCC	53.4	-	66)
<i>acnes</i> 23S_sequence-R <sup>a</sup>	AACTACCCATCAGGCACTGT	53.2		
<i>P. acnes</i> _23S-seq2-F <sup>a</sup>	TTGACTGTGAGACTGACAGG	50.3	-	This study
<i>P. acnes</i> _23S-seq2-R <sup>a</sup>	ATCACAACCCGACGTAGCCA	60.0		
<i>P. acnes</i> L4seq-F <sup>a</sup>	TGAACGAGACCAAGACCATC	54.6	-	This study
<i>P. acnes</i> L4seq-R <sup>a</sup>	CTGGCTGAACACGATGGTC	56.1		
<i>P. acnes</i> L22(seq)-F <sup>a</sup>	TGGTTCGCGGTATGGAC	54.7	-	This study
<i>P. acnes</i> L22(seq)-R <sup>a</sup>	GACTTGGCTGCAGCTGC	55.0		
16S rRNA 8UA	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	49.7	1478	76)
16S rRNA 1485B	TACGGTTACCTTGTTACGAC	49.2		
<i>acnes</i> 16S-F <sup>a</sup>	GAGCGAACAGGCTTAGATAC	55.8	-	This study
<i>acnes</i> 16S-R <sup>a</sup>	TCGGGTGTTACCAACTTTCA	55.2		
SLST-F <sup>a</sup>	CAGCGGCGCTGCTAAGAACTT	62.7	Variable	25)
SLST-R <sup>a</sup>	CCGGCTGGCAAATGAGGCAT	66.1		

<sup>a</sup>, sequencing primer; <sup>b</sup>-, no product



## 9. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE)

PFGE 法における DNA の抽出、制限酵素による切断は、Oprica らが報告した方法を改良して行った<sup>83)</sup>。試料となる *P. acnes* 株を変法 GAM 寒天培地にて嫌気条件下で 35°C、48 hr 培養した。増殖した菌を EET buffer (100 mM ethylenediaminetetraacetic acid: EDTA、10 mM ethylene glycol tetraacetic acid: EGTA、10 mM Tris-HCl) に懸濁し、吸光度 optical density (O. D. <sub>600nm</sub>) 0.4 の濃さに懸濁した。得られた懸濁液 150 µl に 25 mg/ml lysozyme (Wako) 6 µl と embedding agarose [1.5% low melting point agarose (Bio-Rad)、10 mM Tris-HCl (pH 8.0)、0.1 M NaCl] 150 µl を加え、直ちに Disposable Plug Mold (Bio-Rad) に 100 µl 流し込み、4°C、30 min 冷やし固めた。固まったプラグを 25 mg/ml lysozyme 150 µl と 2×Lysis buffer [12 mM Tris (pH 7.5)、1% N-lauroyl sarcosine sodium salt、2% polyethylene glycol、1% polyoxyethyleneglycol dodecyl ether: brij 35、0.4% sodium deoxycholate] 150 µl の混合液に移し、37°C、6 hr の反応をさせた。その後、20 mg/ml Proteinase K (Wako) 12 µl を入れた Proteolysis buffer (1% SDS、0.5 M EDTA) 300 µl に移し替え、50°C、12 hr 反応させた。プラグを TE buffer [10 mM Tris-HCl、1 mM EDTA (pH 8.0)] 600 µl で、60 分毎に室温で 4 回洗浄した。TE buffer を除去した後、*SpeI* buffer [0.01% bovine serum albumin (Wako)、10 mM Tris-HCl (pH 7.5)、10 mM MgCl<sub>2</sub>、1 mM dithiothreitol、50 mM NaCl] 500 µl を加え、室温で 60 min 放置し、プラグを洗浄した。*SpeI* (TaKaRa) 2 µl、*SpeI* buffer 300 µl を加えた新しい microtube にプラグを移し、37°C、20 hr 反応させた。その後、プラグは 1% Pulsed Field Certified Agarose (Bio-Rad) ゲルの中に挿入し、CHEF Mapper (Bio-Rad) を用いて泳動した (initial switch time, 2.98 sec; final switch time, 12.02 sec; run time, 24 hr; angle, 120°; gradient, 6V/cm; temperature, 14°C; ramping factor, linear)。得られた PFGE パターンは、Bio Numerics (Applied Maths, Ver.6.10) を用いて解析した。系統樹は Dice 係数を用いた平均距離法 (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean: UPGMA) により作成した (band tolerance 1.0%, optimization 1.0%)。65%以上の類似性を示す株を同一の pulsotype に分類した。また、100%の相同性を示す菌株以外を遺伝学的に異なる菌株であると判定した。

## 10. 耐性変異株出現頻度の測定

変異株出現頻度の測定は、各種抗菌薬を 0.008 ~ 128 µg/ml 含有した変法 GAM 寒天培地に、10<sup>10</sup> CFU/ml 程度に調製した試験菌液 0.1 ml (10<sup>9</sup> CFU) を塗抹し、嫌気的条件下で 96 hr 培養、判定した<sup>84)</sup>。試験菌液は、変法 GAM ブイヨン (Nissui) に菌を懸濁し 48 hr 培養後、4°C、4,000 ×g、10 min の遠心によって集菌し、上清を除去した。菌沈殿物を滅菌生理食塩水にて調製した。耐性変異株出現頻度は、各薬剤含有培地に発育したコロニー数と薬剤非含有培地上の発育コロニー数から算出した。この操作を 3

回行い、その平均値を変異株出現頻度とした。また、コロニーの発育が認められなくなった薬剤濃度を耐性変異株出現阻止濃度 mutation prevention concentration (MPC) とし、耐性変異株を優位に増殖させる濃度域である耐性変異株選択領域 mutant selection window (MSW) は MPC/MIC の値で評価した。

## 11. 統計学的解析

統計学的解析は、重症度と患者の年齢に関しては、Student の  $t$  検定を用い、重症度と耐性率および耐性株分離率と抗菌薬使用歴の比較には、 $\chi^2$  検定を用いた。それぞれの有意水準は  $P < 0.05$ 、信頼区間は 95% で解析した。

## 12. 倫理的配慮

西嶋皮膚科より提供された検体は、患者のインフォームドコンセントを取り、個人が特定される情報は完全に切り離され、細菌検体として提供されたものを使用した。東京女子医科大学病院では倫理委員会承認の下、患者のインフォームドコンセントを取り、検体採取が行われた。アンケート調査が行われたが、個人が特定される情報は完全に切り離されている。

## 【 結 果 】

### 1. クリニック由来 *P. acnes* 株の解析

#### 1-1. 薬剤感受性

クリニックを受診した痤瘡患者由来 143 株の *P. acnes* について、各種抗菌薬感受性を測定した (Table 6)。2008 年から 2010 年にかけて、 $\beta$ -ラクタム系薬の amoxicillin、cefaclor、cefdinir、cefditoren、faropenem に対しては、良好な感受性を示し、耐性株は認められなかった。一方、キノロン系薬の levofloxacin に耐性を示す株が、2008 年に 1 株 (3.4%)、2009 年に 1 株 (3.4%)、2010 年に 3 株 (6.0%) 認められた。また、マクロライドおよび clindamycin 耐性株の割合は、2008 年は 27.6% と非常に高い耐性率を示したが、2009~2011 年は 5% 前後を推移していた。2008 年は開局直後であり、初診患者が少なく、大学病院に通院していた患者が多く訪れたためと推論された。また、テトラサイクリン系薬の doxycycline に対しては、耐性株が 2008 年に 1 株のみ認められた。

#### 1-2. MLS<sub>B</sub> 耐性因子の解析

全 164 株の *P. acnes* に対して、高度 MLS<sub>B</sub> 耐性に寄与する *erm*(X) の保有率を調査したところ、2008 年で 4 株 (78a、83a、88a、96b) が認められたが、2009 年以降は認められなかった (Table 7)。測定したいずれかのマクロライド系薬に耐性を示した 12 株 (2008, 8 株; 2009, 1 株; 2010, 3 株) について 23S rRNA 遺伝子の塩基配列解析を行った (Table 7)。解析の結果、A2058G 変異が 5 株、A2059G 変異が 1 株で認められた。また、2058 位における adenine から thymine (RNA では uracil) への変異 (A2058T) が 2 株で認められた。A2058T 変異株は今まで報告されておらず、その感受性は、14 員環マクロライドには高度耐性を示すが、16 員環マクロライドおよび clindamycin に対しては、耐性ブレイクポイント以下の低感受性レベルであり、A2058G 変異株と異なる耐性パターンを示した。また、マクロライドおよび clindamycin に高度耐性を示すにも関わらず、耐性因子が認められない株 (84a) も存在した。

#### 1-3. テトラサイクリン耐性因子の解析

Doxycycline に耐性を示した 84a 株について、16S rRNA 遺伝子の塩基配列解析を行ったところ、1036 位の guanine から cytosine への変異 (G1036C) が認められた (Table 7)。

Table 6. Antimicrobial susceptibilities of *P. acnes* strains isolated from patients with acne vulgaris in a clinic during 2008 and 2011

Antimicrobial agent	MIC range (µg/ml) <sup>a</sup>				% of Resistance			
	2008 (n = 29)	2009 (n = 29)	2010 (n = 50)	2011 (n = 35)	2008	2009	2010	2011
Amoxicillin	≤0.06 - 0.25	≤0.06 - 0.13	≤0.06 - 2	≤0.06 - 0.13	0	0	0	0
Cefaclor	2 - 32	0.25 - 4	0.25 - 4	0.13 - 1	0	0	0	0
Cefdinir	≤0.06 - 0.5	≤0.06	≤0.06	≤0.06	0	0	0	0
Cefditoren	≤0.06 - 0.25	≤0.06	≤0.06	≤0.06 - 0.13	0	0	0	0
Faropenem	≤0.06	≤0.06	≤0.06	≤0.06	0	0	0	0
Ciprofloxacin	0.13 - 16	0.13 - 16	0.13 - 16	0.25 - 1	6.9	3.4	6.0	0
Levofloxacin	0.13 - 8	0.13 - 8	0.13 - 8	≤0.06 - 1	3.4	3.4	6.0	0
Nadifloxacin	≤0.06 - 4	0.13 - 2	≤0.06 - 4	≤0.06 - 0.5	-	-	-	-
Erythromycin	≤0.06 - ≥256	≤0.06 - ≥256	≤0.06 - ≥256	≤0.06 - 128	27.6	3.4	6.0	5.7
Clarithromycin	≤0.06 - ≥256	≤0.06 - ≥256	≤0.06 - ≥256	≤0.06 - 128	27.6	3.4	6.0	5.7
Roxithromycin	≤0.06 - ≥256	≤0.06 - ≥256	≤0.06 - ≥256	≤0.06 - ≥256	27.6	3.4	6.0	5.7
Clindamycin	≤0.06 - ≥256	≤0.06 - 64	≤0.06 - 32	0.06 - 4	27.6	3.4	6.0	0
Doxycycline	0.25 - 64	0.13 - 8	0.13 - 1	0.06 - 2	3.4	0	0	0
Minocycline	0.25 - 16	≤0.06 - 0.5	≤0.06 - 0.5	0.06 - 2	3.4	0	0	0
Gentamicin	1 - 8	4 - 16	1 - 8	0.5 - 32	-	-	-	-
Chloramphenicol	0.25 - 16	0.25 - 4	0.13 - 1	0.13 - 1	0	0	0	0
Fusidic acid	2 - 8	0.5 - 4	≤0.06 - 4	0.25 - 8	0	0	0	0

<sup>a</sup> MIC range, range of minimum inhibitory concentration (µg/ml); ≤, or less; ≥, or more.

Table 7. Classification of *P. acnes* strains by resistance patterns of macrolides, clindamycin and tetracyclines in a clinic

Strain	Year	MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )				<i>erm</i> (X)	23S rRNA mutation	16S rRNA mutation
		Clarithromycin	16-Mac <sup>a</sup>	Clindamycin	Doxycycline			
		(14-Mac)		(Linco)	(Tetracyclines)			
78a	2008	$\geq 256$	$\geq 256$	$\geq 256$	2	+	Wild	Wild
83a	2008	$\geq 256$	$\geq 256$	$\geq 256$	0.5	+	Wild	Wild
84a	2008	$\geq 256$	$\geq 256$	$\geq 256$	64	-	Wild	G1036C
86a	2008	$\geq 256$	2	128	1	-	A2058G	Wild
88a	2008	$\geq 256$	$\geq 256$	$\geq 256$	4	+	Wild	Wild
95a	2008	$\geq 256$	$\geq 256$	32	1	-	A2059G	Wild
96b	2008	$\geq 256$	$\geq 256$	$\geq 256$	4	+	Wild	Wild
102a	2008	$\geq 256$	$\geq 256$	4	0.25	-	A2059G	Wild
121a	2009	$\geq 256$	64	64	0.5	-	A2058G	Wild
169a	2010	$\geq 256$	32	64	0.25	-	A2058G	Wild
175	2010	$\geq 256$	32	64	0.25	-	A2058G	Wild
208b	2010	$\geq 256$	32	128	0.25	-	A2058G	Wild
215c	2011	$\geq 256$	8	2	1	-	A2058T	Wild
244c	2011	$\geq 256$	32	4	1	-	A2058T	Wild

<sup>a</sup> Jasamycin was used in 2008 and spiramycin was used in 2009 to 2011.

Mac, macrolides; Linco, lincosamides.

## 2. 大学病院由来 *P. acnes* 株の解析

### 2-1. 薬剤感受性

クリニックの 2008 年において、高い MLS<sub>B</sub> 耐性率を示した原因として、大学病院外来患者が紹介により多数来院していたことが考えられた。そこで、地域は異なるが、大学病院専門外来を受診した痤瘡患者由来 69 株の *P. acnes* について、各種抗菌薬感受性を測定した (Table 8)。また、*P. acnes* の薬剤感受性を集団として把握するために、90% の菌株の発育を阻止する濃度 (MIC<sub>90</sub>) および 50% の菌株の発育を阻止する濃度 (MIC<sub>50</sub>) を算出した。その結果、β-ラクタム系薬である amoxicillin、cefaclor、cefdinir、cefditoren、faropenem の全ての薬剤で良好な感受性を示し、耐性株は認められなかった。一方、キノロン系薬の ciprofloxacin、levofloxacin に耐性を示す株が 3 株 (4.3%) 認められ、それらは nadifloxacin の MIC が 16 μg/ml を示した。マクロライドおよび clindamycin 耐性率は、それぞれ 23.2%、18.8%であった。テトラサイクリン系薬の doxycycline に耐性を示す株が 3 株 (4.3%) 認められた。これは、痤瘡治療経験が長いあるいは重症痤瘡患者では、薬剤耐性 *P. acnes* が高頻度に定着していることを示唆している。

### 2-2. MLS<sub>B</sub> 耐性因子の解析

全 69 株の *P. acnes* に対して、高度 MLS<sub>B</sub> 耐性に寄与する *erm(X)* の保有率を調査したところ、1 株 (J-13b 株) で保有が認められた (Table 9)。測定したいずれかのマクロライド系薬に耐性を示した 16 株について 23S rRNA 遺伝子の塩基配列解析を行った結果、A2058G 変異を 11 株が、A2059G 変異を 3 株が有していた。加えて、新規の変異である 2611 位における cytosine から guanine への変異 (C2611G) が 1 株で認められた。C2611G 変異株は 14 員環マクロライドには高度耐性を示すが、16 員環マクロライドおよび clindamycin に対しては、感受性株と同等の MIC を示した。SLST により遺伝型を決定したが、耐性株に特異的に認められる型や耐性因子に特異的な型は認められなかった。

### 2-3. テトラサイクリン耐性因子の解析

Doxycycline に耐性を示した 3 株について 16S rRNA 遺伝子の塩基配列解析を行ったところ、G1036C 変異が 3 株全てで認められた (Table 9)。

Table 8. Antimicrobial susceptibility of *P. acnes* (n = 69) isolated from patients with acne vulgaris in a hospital

Antimicrobial agent	MIC (µg/ml) <sup>a</sup>			% (No.) of Resistance
	MIC range	MIC <sub>50</sub>	MIC <sub>90</sub>	
Amoxicillin	≤0.06 - 0.25	≤0.06	0.13	0
Cefaclor	0.5 - 2	1	2	0
Cefdinir	≤0.06 - 0.125	≤0.06	≤0.06	0
Cefditren	≤0.06 - 0.25	≤0.06	0.13	0
Faropenem	≤0.06	≤0.06	≤0.06	0
Ciprofloxacin	0.13 - 32	1	1	4.3 (3)
Levofloxacin	0.25 - 32	0.5	1	4.3 (3)
Nadifloxacin	0.25 - 16	0.25	0.5	-
Erythromycin	≤0.06 - ≥256	≤0.06	≥256	23.2 (16)
Clarithromycin	≤0.06 - ≥256	≤0.06	≥256	23.2 (16)
Roxithromycin	≤0.06 - ≥256	≤0.06	≥256	23.2 (16)
Spiramycin	≤0.06 - ≥256	≤0.06	≥256	21.7 (15)
Clindamycin	≤0.06 - ≥256	≤0.06	128	18.8 (13)
Gentamicin	0.25 - 32	32	32	-
Doxycycline	0.13 - 16	0.25	1	4.3 (3)
Minocycline	≤0.06 - 8	0.13	0.25	0
Chloramphenicol	0.25 - 1	0.5	0.5	0
Fusidic acid	≤0.06 - 8	8	8	0

<sup>a</sup> MIC range, range of minimum inhibitory concentration (µg/ml); ≤, or less; ≥, or more.

MIC<sub>50</sub> and MIC<sub>90</sub>, the values indicate the MICs (µg/ml) that inhibit the growth of 50 and 90% of strains, respectively.

Table 9. Classification of *P. acnes* strains by resistance pattern of macrolides, clindamycin and tetracyclines in a hospital

Strain	SLST	MIC (µg/ml)				<i>erm</i> (X)	23S rRNA	16S rRNA
		Clarithromycin	Spiramycin	Clindamycin	Doxycycline		mutation	mutation
J-6	A5	≥256	32	64	0.13	-	A2058G	Wild
J-9	C1	≥256	32	128	16	-	A2058G	G1036C
J-11	C2	≥256	32	128	16	-	A2058G	G1036C
J-13b	A1	≥256	≥256	≥256	0.25	+	Wild	Wild
J-24b	ND	≥256	128	64	0.13	-	A2058G	Wild
J-28b	A5	≥256	128	128	0.13	-	A2058G	Wild
J-29	A2	≥256	128	128	0.13	-	A2058G	Wild
J-34b	C2	≥256	128	64	16	-	A2058G	G1036C
J-37b	K1	≥256	≥256	8	0.25	-	A2059G	Wild
J-43b	F4	≥256	64	128	0.25	-	A2058G	Wild
J-45	A2	≥256	64	32	1	-	A2058G	Wild
J-62b	A5	≥256	32	32	0.13	-	A2058G	Wild
J-68b	K1	≥256	1	0.25	0.13	-	C2611G	Wild
J-71b	A5	≥256	64	128	0.13	-	A2058G	Wild
J-77b	A2	≥256	≥256	0.5	2	-	A2059G	Wild
J-90b	F4	≥256	64	0.5	0.25	-	A2059G	Wild

ND, not determined, ≥, or more.



#### 2-4. PFGE による近縁性解析および遺伝型解析

全 69 株の *P. acnes* および ATCC 11828 株について、PFGE 解析を行い、MLS<sub>B</sub> 耐性および痤瘡重症度との関連性を解析した (Fig. 3)。溶菌できなかった 1 株は、解析対象から除外した。解析の結果、菌株全体の相同性は低く、MLS<sub>B</sub> 耐性株や重症患者由来株の間で関連性は認められなかった。つまり、MLS<sub>B</sub> 耐性の多くを占める 23S rRNA の変異は流行しているのではなく、偶発的に生じていることが示された。

重症患者から分離された 15 株の *P. acnes* に対して、MLST<sub>9</sub> および SLST による遺伝型分類を行った (Table 10)。SLST による解析では、菌株全体の遺伝型割合と比較して大きな違いは認められなかった。MLST<sub>9</sub> では、ST26 が多く認められたが、重症株全体で共通した特徴は認められなかった。

#### 2-5. 痤瘡患者の重症度と薬剤使用歴

大学病院患者で高頻度に耐性株が分離されたことから、痤瘡患者の重症度と年齢の関連性を解析した。その結果、軽症の痤瘡患者 (26.9 歳) より重症患者 (23.3 歳) の平均年齢が有意に低かった ( $P < 0.05$ ) (Fig. 4A)。また、重症患者から分離された *P. acnes* は、MLS<sub>B</sub> 耐性株が多く認められ、重症および最重症患者株の MLS<sub>B</sub> 耐性率は 40.0% (6/15 名)、中等症患者株では 12.9% (4/31 名)、軽症患者株では 18.8% (3/16 名) であった。MLS<sub>B</sub> 耐性株が分離された患者について、抗菌薬の使用歴を調査すると、MLS<sub>B</sub> 耐性株分離患者では、81.3% (13/16 名) がマクロライド系薬もしくは clindamycin を過去に使用しており、MLS<sub>B</sub> 感受性株分離患者の 31.9% (15/47 名) に比べ、有意に高い使用率を示した ( $P < 0.001$ ) (Fig. 4B)。

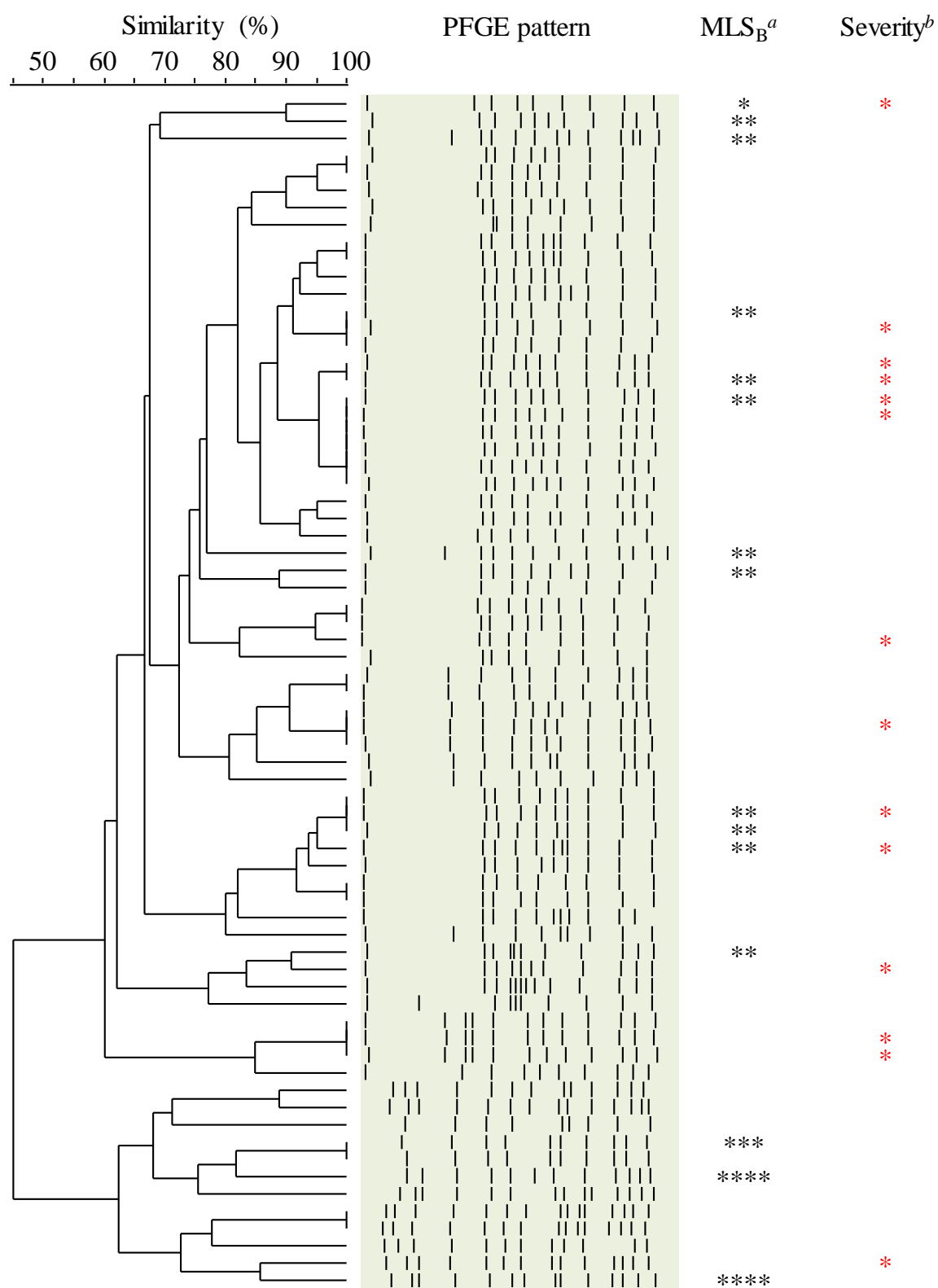


Fig. 3. PFGE analysis of *P. acnes* (n = 68)

<sup>a</sup> MLS<sub>B</sub>-resistant strains. \*, strain carrying *erm*(X); \*\*, strains with the mutation of A2058G in 23S rRNA; \*\*\*, strain with the mutation of C2611G; \*\*\*\*, strains with the mutation of A2059G. <sup>b</sup> \*, strains isolated from patients with severe and very severe acne vulgaris.

Table 10. Phylogenetic analysis of *P. acnes* isolated from patients with severe acne

Strain	Alleles number and MLST <sub>9</sub> type										SLST
	<i>cel</i>	<i>coa</i>	<i>fba</i>	<i>gms</i>	<i>lac</i>	<i>oxc</i>	<i>pak</i>	<i>recA</i>	<i>zno</i>	ST	
J-10b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	H1
J-13b	5	9	1	8	4	3	3	5	6	11	A1
J-14	5	9	2	8	4	3	3	5	5	8	A2
J-24b	5	9	1	8	4	3	3	5	6	11	A2
J-32	5	9	4	3	4	3	3	2	11	67	F4
J-34b	5	9	4	8	5	3	3	5	11	3	C2
J-42b	5	4	3	3	4	3	5	1	9	41	H1
J-45	5	9	2	8	4	3	3	5	5	8	A2
J-46b	5	9	4	8	4	2	3	5	11	26	A5
J-49b	7	9	4	3	4	3	3	2	11	70	F4
J-61	5	9	4	8	4	2	3	5	11	26	A5
J-62b	5	9	4	8	4	2	3	5	11	26	A5
J-71b	5	9	4	8	4	2	3	5	11	26	A5
J-73b	3	13	8	11	7	6	7	6	14	51	K1
J-74	5	9	4	8	4	2	3	5	11	26	K1

-, not determined

Each group of red, blue, and green colored STs showed single and double locus variants.

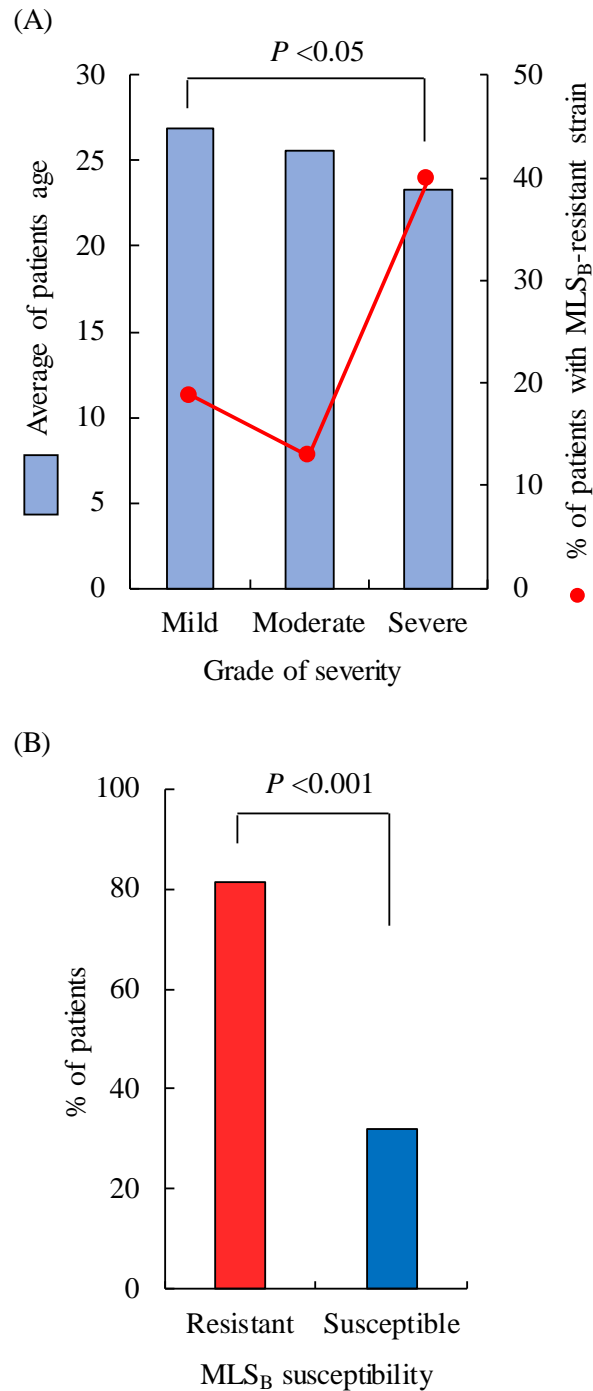


Fig. 4. Analysis of patient information

(A) Average of patients' age and % of patients with MLS<sub>B</sub>-resistant strain isolated from various severity grade patients. Severe grade contains severe and very severe patients. The star indicates a statistically significant difference between mild and severe case in average of patients age using the Student's *t*-test ( $P < 0.05$ ). (B) Histories of macrolides and clindamycin use in patients with MLS<sub>B</sub>-resistant strain. Most patients with resistant strain previously used antimicrobials (81.3%) than patients with susceptible strain (31.9%) ( $P < 0.001$ ).

### 3. 各種抗菌薬の耐性株出現阻止濃度の測定

耐性変異株が出現しない最小の薬剤濃度を耐性株出現阻止濃度 (MPC) といい、耐性菌出現を抑制するための抗菌薬適正使用における指標の一つとなっている。そこで、痤瘡治療において、内服薬と外用薬で繁用されているマクロライド系およびキノロン系薬について、MPC の測定を行った。Clarithromycin における 8×MIC (0.063 µg/ml) の耐性変異株出現頻度は、 $6.8 \times 10^{-10}$  であった (Fig. 5)。Clindamycin における 1×MIC (0.063 µg/ml) での変異耐性株出現頻度は、 $6.8 \times 10^{-10}$  であり、2×MIC 以上では耐性変異株が認められなかった。Levofloxacin の 32×MIC (4 µg/ml) における耐性変異株出現頻度は  $2.8 \times 10^{-9}$  であり、nadifloxacin の 16×MIC (2 µg/ml) における出現頻度は  $7.5 \times 10^{-9}$  であった。Clarithromycin の MSW は 16 であり、clindamycin の MSW は 2 と非常に小さかった (Table 11)。一方、キノロン系薬では、levofloxacin の MSW は 64 (MPC, 8 µg/ml)、nadifloxacin の MPC は 32 (MPC, 4 µg/ml) と比較的大きな値を示した。

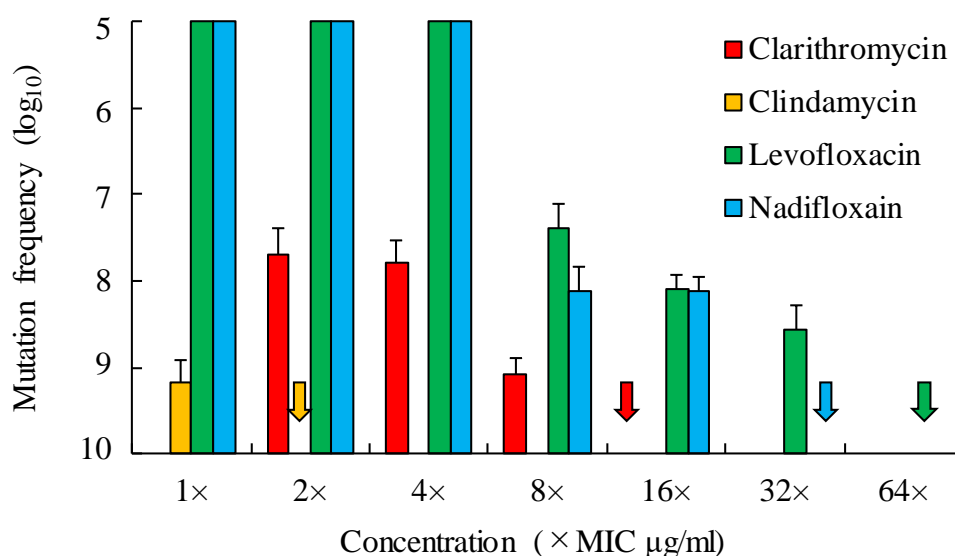


Fig. 5. Mutation frequencies in *P. acnes* ATCC6919

Mutation frequencies for 2×, 4× and 8×MIC of clarithromycin were  $1.96 \times 10^{-8}$ ,  $1.6 \times 10^{-8}$  and  $8.48 \times 10^{-10}$ ; 2×MIC of clindamycin was  $6.8 \times 10^{-10}$ ; 8×, 16× and 32×MIC of levofloxacin were  $4.1 \times 10^{-8}$ ,  $8.2 \times 10^{-9}$  and  $2.8 \times 10^{-9}$ ; and, 8× and 16×MIC of nadifloxacin were  $7.4 \times 10^{-9}$  and  $7.5 \times 10^{-9}$ , respectively. Each color arrow indicated MPCs of *P. acnes* for antimicrobial agent.

Table 11. Antimicrobial susceptibility of *P. acnes* ATCC11828

Antimicrobial agent	MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )	MPC ( $\mu\text{g/ml}$ )	MSW (MPC/MIC)
Clarithromycin	0.008	0.125	16
Clindamycin	0.063	0.125	2
Levofloxacin	0.125	8	64
Nadifloxacin	0.125	4	32

MIC, minimum inhibitory concentration.

MPC, mutant prevention concentration.

MSW, mutant selection window.

## 【 考 察 】

世界中で痤瘡患者由来薬剤耐性 *P. acnes* は見出されており、増加傾向にある<sup>59, 60)</sup>。日本において、痤瘡患者由来 *P. acnes* の薬剤感受性について、いくつか報告されており少数ではあるが耐性株も分離されている<sup>41, 79)</sup>。本章では、現在の日本における痤瘡患者由来 *P. acnes* の薬剤感受性状況を明らかにするために、皮膚科クリニックおよび大学病院受診患者の調査を同時期に行った。

クリニック由来株では、2008 年に 27.6%、2009 年に 3.4%、2010 年に 6.0%、2011 年に 5.7%の株が MLS<sub>B</sub> 耐性を示した (Fig. 6)。2008 年に顕著に高い耐性率を示した原因は、2008 年はクリニックが開局直後であり、大学病院からの紹介患者が多かったことと考えられた。そこで、大学病院の外来患者由来 *P. acnes* の感受性を測定したところ、MLS<sub>B</sub> 耐性率は 23.2%を示した。つまり、2009 年以降の 5%前後の MLS<sub>B</sub> 耐性率がクリニックにおける耐性率であると考えられた。以上より、軽症の患者や未治療患者の診療が多くを占める市中のクリニックでは、MLS<sub>B</sub> 耐性株は少数存在しているが、多くが良好な感受性を示すことが明らかとなった。大学病院は、一般的に重症患者や治療失敗による紹介患者が多く受診する。そのため、MLS<sub>B</sub> 耐性株分離患者では、過去の痤瘡治療で抗菌薬を使用していた割合が高く、クリニック由来株に比べ高い MLS<sub>B</sub> 耐性率を示したと考えられる。しかし、単一施設や単年の調査であるため、耐性株の動向を正確に把握するためには継続した調査を行う必要がある。

さらに、薬剤耐性因子の解析を行うと、2008 年に高度 MLS<sub>B</sub> 耐性に寄与する *erm(X)* 保有 *P. acnes* が日本で初めて検出された。*erm(X)* 保有 *P. acnes* は、マクロライド系薬だけでなく、外用薬として使用される clindamycin に対しても高度耐性を示すことから<sup>59)</sup>、痤瘡治療を難渋させるリスク因子となる。そのため、今後の流行に注意しなければならない。

しかしながら、*P. acnes* の MLS<sub>B</sub> 耐性のほとんどは、23S rRNA の変異により生じており、抗菌薬の使用により個々の患者で出現していることが示唆された。加えて、重症度と MLS<sub>B</sub> 耐性 *P. acnes* の関連性を解析すると、重症及び最重症患者由来株での MLS<sub>B</sub> 耐性率は 40.0% と中等症患者株および軽症患者株に比べ、著しく高い値を示した。PFGE パターンでも同様の傾向が認められ、重症患者からは薬剤耐性 *P. acnes* の分離頻度が高いことが示された。重症患者は、抗菌薬による痤瘡治療が難渋し、長期に渡って治療を行っていることが推測される。そのため、抗菌薬で選択された耐性株が菌交代現象により定着してしまっていると推測される。つまり、有効性の低い抗菌薬治療を行うことで、耐性菌が出現していることが強く示唆された。

MLS<sub>B</sub> 耐性 *P. acnes* の分離頻度が高いことから、clarithromycin および clindamycin の

耐性変異株出現への影響を調査した。MSW を算出すると、clarithromycin は 16、clindamycin は 2 であった。Clarithromycin などのマクロライド系抗菌薬は内服薬として使用されるため、痤瘡患部への到達濃度は外用薬に比べ低くなる。加えて、抗菌薬の飲み忘れや中止などの不適切な薬剤使用は、さらに薬剤曝露濃度の低下させる原因となり、耐性菌を増加させる要因となる。痤瘡における抗菌薬治療は、3 ヶ月と長期になることから、*P. acnes* に対して感受性のある抗菌薬を使用することに加え、患者のコンプライアンスを維持することが治療の成功に重要であると考えられる。

以上より、第 1 章では、日本における痤瘡患者由来 *P. acnes* の薬剤感受性状況を示した。*erm(X)* 保有 *P. acnes* だけでなく、キノロン耐性、テトラサイクリン耐性株が本邦に存在することを初めて明らかにした。加えて、病院と市中のクリニックでは異なる背景を有する患者の受診により、薬剤耐性率が異なることを明らかにした。そこで、痤瘡患者の重症度および抗菌薬使用と耐性株保有の関連性について解析したところ、重症度が高く、抗菌薬使用歴のある患者ほど耐性菌が高頻度に分離されることを明らかにした。日本における抗菌薬の使用量は増加しており、痤瘡治療においても同様であると考えられ、薬剤耐性 *P. acnes* がさらに増加することが予測される<sup>85)</sup>。抗菌薬を漫然と使用するのではなく、本邦における *P. acnes* の薬剤感受性を把握し、剤形を含めた抗菌薬の特徴を理解し、処方することで、耐性菌を出現させない効果的な薬物治療を行うことができると考える。

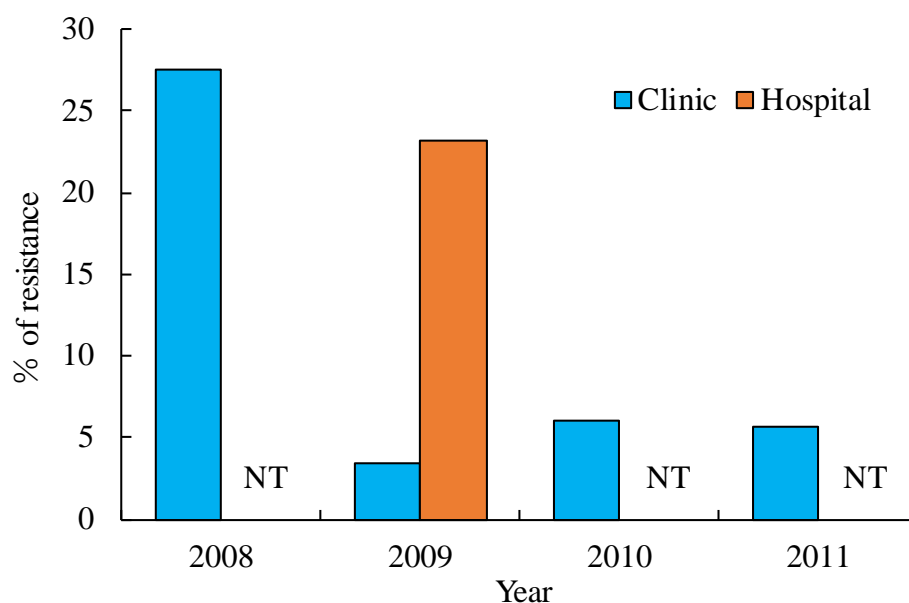


Fig. 6. Annual change of MLS<sub>B</sub> resistant *P. acnes* in clinic and hospital  
NT, not tested.



## 第 2 章

*P. acnes* における

テトラサイクリン段階的耐性機構の

解析

## 【 緒 言 】

一般的に、痤瘡における抗菌薬治療は外用薬を中心として行われるが、中等症以上の患者には内服薬の併用が行われる<sup>37)</sup>。内服薬として、テトラサイクリン系薬の minocycline、doxycycline は、抗炎症作用を有し組織移行性が良いことから多くの国や地域で繁用されている。しかし、近年、世界中で *P. acnes* のテトラサイクリン系薬への耐性化が報告されている<sup>57)</sup>。痤瘡治療において経口のテトラサイクリン系薬を頻繁に使用している英国においては、痤瘡患者由来 *P. acnes* の約 50% がテトラサイクリン耐性を示すことが報告されている<sup>62)</sup>。また、最近では、テトラサイクリン系薬は、痤瘡治療だけでなく sarcoidosis の治療にも使用されている<sup>86)</sup>。

細菌における既知のテトラサイクリン耐性機構として、*tetK* を代表とする排出タンパク質をコードする遺伝子の獲得や *tetM* などのリボソームの保護タンパク質をコードする遺伝子の獲得が報告されている<sup>87)</sup>。他にも、薬剤結合部位である 16S rRNA の変異や *rpsC* および *rpsJ* 遺伝子にコードされる ribosomal S3 および S10 protein 変異によるテトラサイクリン耐性機構が知られている<sup>88)</sup>。*P. acnes* においては、薬剤結合部位である 16S rRNA の 1036 位 (大腸菌 1058 位に相当) における guanine から cytosine への変異 (G1036C) のみが報告されている (Fig. 7)<sup>62, 77)</sup>。

痤瘡治療における標準内服量とされる doxycycline 100 mg/day の内服を行うと、その血中薬物濃度は理論的に 1.5 µg/ml 程度となると考えられ、毛包内ではさらに低いと推定される<sup>89)</sup>。そのため、doxycycline に対して MIC 1 ~ 2 µg/ml を示す低感受性株

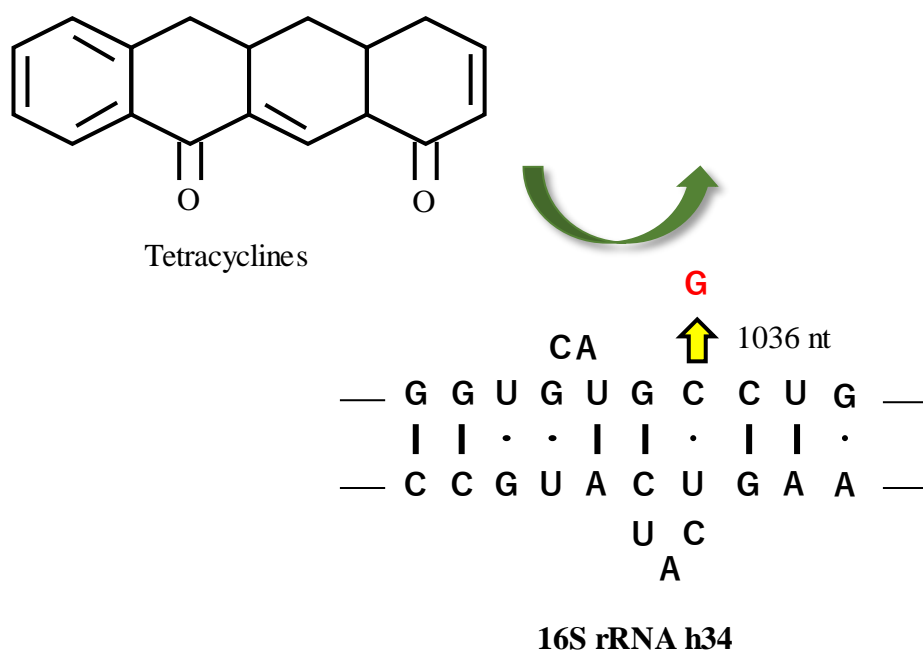


Fig. 7. Structure of the h34 in 16S rRNA that is tetracyclines binding site

に対しては抗菌作用を示さない恐れがある。従って、テトラサイクリン低感受性株の出現、流行は痤瘡の抗菌薬治療において極めて重要であるといえる。第1章において、本邦の痤瘡患者由来 *P. acnes* から、doxycycline に対して MIC 1 ~ 2 µg/ml を示す低感受性株および 16S rRNA 遺伝子の変異を有する耐性株を分離した。しかし、低感受性株の耐性機構は不明である。

そこで、本研究では、テトラサイクリン低感受性および耐性 *P. acnes* における耐性機構と耐性菌出現機構に関する研究を行った。

## 【 方 法 】

### 1. 使用菌株

菌株は、第 1 章と同様の 2009 年から 2010 年に東京女子医科大学病院を受診した痤瘡患者 69 名から分離された 69 株の *P. acnes* を使用した。倫理的配慮は、第 1 章【方法】12 と同様に行い、実施された。薬剤感受性の測定には、薬剤感受性基準株として ATCC6919 株を使用した<sup>66)</sup>。16S rRNA 遺伝子と、*rpsC* および *rpsJ* 遺伝子の wild type として ATCC11828 株 (Accession number: CP003084) を使用した。

### 2. *P. acnes* の遺伝学的分類法による解析

*P. acnes* の遺伝学的分類は、第 1 章【方法】8 に記した SLST で行った。

### 3. 薬剤感受性の測定

薬剤感受性は MIC を測定し、評価した。方法は第 1 章【方法】3 に記した agar dilution procedure で行った。薬剤は、doxycycline、minocycline、tigecycline (Pfizer) を使用した。薬剤排出阻害による感受性の変化を測定するために、薬剤排出阻害薬である reserpine 20 µg/ml を含有した薬剤入り寒天培地および reserpine を含まない薬剤入り寒天培地を作製し、同一の実験系内で MIC の測定を行った<sup>90)</sup>。Reserpine 非存在下の MIC が、存在下の MIC の 1/4 倍以下を示した場合、reserpine 感受性の排出が亢進しているとした。薬剤排出の positive control として、痤瘡患者由来で薬剤排出ポンプ *tetK* を保有する *Staphylococcus epidermidis* 79a 株を使用した。

### 4. テトラサイクリン耐性因子の解析

テトラサイクリン耐性化に関与する 16S rRNA 遺伝子、ribosomal S3 および S10 protein をコードする *rpsC* および *rpsJ* 遺伝子の DNA シーケンスを行った。DNA シーケンス法は、第 1 章【方法】7 に従い実施した。増幅およびシーケンスに使用したプライマーは Table 12 に示した。

### 5. テトラサイクリン耐性変異株の作製

耐性変異株の作製は、親株として ATCC11828 株を使用した。親株を変法 GAM ブ

イオンで 35°C、嫌気条件下で 48 hr 培養し、 $10^{10}$  CFU/ml 程度となるように濃縮した。濃縮菌液は、doxycycline を 2 倍濃度ごとに 0.25 ~ 32  $\mu$ g/ml 含んだ変法 GAM 寒天培地に 0.1 ml 塗布し、1 週間、35°C、嫌気条件下で培養を行った<sup>84)</sup>。増殖したコロニーから 12 株を選択し、テトラサイクリン耐性変異株として研究に使用した。

Table 12. Amplification and Sequencing primers used in this study

Primer	Oligonucleotide (5' to 3')	Tm (°C)
rpsC-F	GCCAAGTCCGAGACCGAGAA	61.2
rpsC-R	GTCCACCACGACCGCCCTG	65.7
rpsJ-F	CACAGTGTTACGGGGT	51.5
rpsJ-R	CACCAGCCTTCTCGAAG	51.0

## 【 結 果 】

### 1. 痤瘡患者由来株のテトラサイクリン感受性

第 1 章で測定した痤瘡患者由来 *P. acnes* のテトラサイクリン系薬の MIC を解析した結果、doxycycline の MIC によって、大きく 3 つのグループに分類された (Fig. 8)。1 つ目に、MIC が 0.25  $\mu\text{g/ml}$  以下の感受性を示すグループで、60 株 (87.0%) が認められた。2 つ目は、MIC が 1 ~ 2  $\mu\text{g/ml}$  と感受性株に比べ MIC がわずかに上昇した感受性低下グループで、6 株 (8.7%) が分離された。また、MIC が 16  $\mu\text{g/ml}$  の耐性を示すグループとして 3 株 (4.3%) が認められた。SLST による遺伝学的分類を行うと、感受性株は 11 のタイプに分類された (A1、A2、A5、A14、A15、C4、F4、H1、H4、K1 および K7)。そのうち、cluster A に含まれる株が最も多く、32 株 (53.3%) であった。一方、感受性低下グループでは 3 つのタイプが認められ、A2 が 3 株、A10 および K1 が 1 株であり、1 株は分類できなかった。耐性グループでは、C1 が 1 株、C2 が 2 株であった。

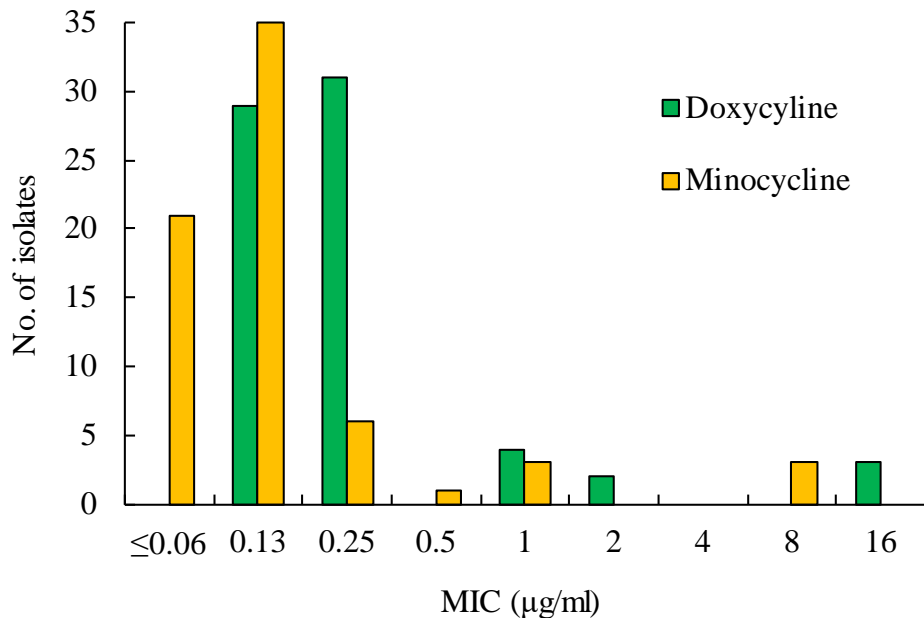


Fig. 8. MIC distribution of tetracyclines in *P. acnes* clinical isolates

## 2. 患者背景

Doxycycline 感受性株が分離された 60 名、低感受性株が分離された 6 名および耐性株が分離された 3 名の平均年齢はそれぞれ  $25.0 \pm 6.2$ 、 $25.5 \pm 4.4$ 、 $20.3 \pm 3.2$  歳であった。瘡瘍治療による内服テトラサイクリン系薬の服用状況は、感受性株分離患者で 11.7%、低感受性株分離患者で 33.3%、耐性株分離患者で 100%と、耐性株分離患者で著しく高い値を示した。

## 3. 瘡瘍患者由来株のテトラサイクリン耐性因子の解析

Doxycycline 低感受性株 (6 株) および耐性株 (3 株) の計 9 株についてテトラサイクリン耐性因子の解析を行った。既知の 16S rRNA 変異について解析すると、3 株全ての doxycycline 耐性株から 16S rRNA の G1036C 変異が認められた (Table 13)。加えて、16S rRNA の 1180 位における adenine から cytosine への変異 (A1180C) が認められた。一方、6 株の doxycycline 低感受性株からは、G1036C 変異は認められなかった。他に、831 位の cytosine から thymine への変異 (C831T)、985 位の thymine から cytosine への変異 (T985C) が認められたが、それらの変異は耐性および感受性株の両方で高頻度に認められた。従って、831~985 位の変異は耐性に関与しないサイレント変異であると考えられた。

ブドウ球菌属などのグラム陽性菌におけるテトラサイクリン耐性の主な機序は、薬剤の排出ポンプをコードする遺伝子の獲得である<sup>87)</sup>。そこで、排出ポンプ阻害剤である reserpine 添加時の MIC を測定した (Table 14)。しかし、非存在下の MIC 値の 1 ~ 1/2 倍となり、排出の亢進は認められなかった。

他のテトラサイクリン耐性機構として、薬剤結合部位の変異による薬剤親和性の低下が考えられる<sup>88,91)</sup>。そこで、テトラサイクリン系薬の標的部位である 16S rRNA の構成タンパク質の ribosomal S3 protein 遺伝子 *rpsC* および S10 protein 遺伝子 *rpsJ* の DNA 配列を解析した (Table 13)。*rpsC* および *rpsJ* 遺伝子の解析を行ったところ、*rpsJ* 遺伝子で doxycycline 耐性および低感受性株の全てで 169~172 位で 5 種の変異が認められ、コードされる S10 protein で K57E (A169G)、K57M (A170T or G171C)、K57N (G171T)、Y58D (T172G) の 4 つのアミノ酸置換が認められた。一方、全ての株において *rpsC* 遺伝子の変異は認められなかった。また、感受性株の解析を行ったが、16S rRNA および *rpsJ* 遺伝子の変異は認められなかった。

Table 13. Tetracyclines resistance profiles of clinically isolated and laboratory-selected strains of *P. acnes*

No.	MIC (µg/ml)			Mutations of tetracycline resistance factor		
	Doxycycline	Minocycline	Tigecycline	16S rRNA	<i>rpsJ</i>	S10 protein
Clinical isolate						
J-9	16	8	2	G1036C, A1180C	T172G	Tyr58Asp
J-11	16	8	2	G1036C, A1180C	T172G	Tyr58Asp
J-15b	1	0.25	0.5	Wild	A169G, T172G	Lys57Glu, Tyr58Asp
J-34b	16	8	2	G1036C, A1180C	T172G	Tyr58Asp
J-45	1	1	0.25	Wild	G171T	Lys57Asn
J-75b	1	0.25	0.25	Wild	G171T	Lys57Asn
J-77b	2	1	0.5	Wild	A170T	Lys57Met
J-83b	2	1	0.5	Wild	A170T	Lys57Met
J-85b	1	0.5	0.5	Wild	G171C	Lys57Met
Laboratory strain						
1-1	4	2	0.5	Wild	A169G	Lys57Glu
1-2	4	2	0.25	Wild	T172G	Tyr58Asp
2-1	4	2	0.5	Wild	A169G	Lys57Glu
2-2	4	2	0.5	Wild	A170G	Lys57Met
2-4	4	2	0.5	Wild	A170T	Lys57Met
ATCC11828	0.13	≤0.06	≤0.06	Wild	Wild	Wild

Strains 3b and ATCC11828 were susceptible clinical isolate and the parental strain. ≤, or less.



Table 14. Susceptibilities of tetracyclines for clinical isolates and laboratory-selected strains

No.	MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )		MIC ( $\mu\text{g/ml}$ ) with reserpine	
	Doxycycline	Minocycline	Doxycycline	Minocycline
Clinical isolate				
J-9	16	8	16	4
J-11	16	8	16	4
J-15b	1	0.25	1	0.25
J-34b	16	8	16	8
J-45	1	1	1	0.5
J-75b	1	0.25	1	0.25
J-77b	2	1	1	1
J-83b	2	1	1	1
J-85b	1	0.5	1	0.5
-----				
Laboratory strain				
1-1	4	2	2	2
1-2	4	2	2	1
2-1	4	2	2	2
2-2	4	2	2	2
2-4	4	2	2	2
-----				
ATCC11828	0.13	$\leq 0.06$	0.13	$\leq 0.06$

$\leq$ , or less.

#### 4. テトラサイクリン耐性変異株の作製

テトラサイクリン耐性化における 16S rRNA および *rpsJ* 遺伝子変異の関与を明らかにするため、*in vitro* でテトラサイクリン耐性変異株の作製を行った。Doxycycline 1  $\mu\text{g/ml}$  と 2  $\mu\text{g/ml}$  の選択で得られた耐性変異株を分離した。それぞれ 6 株ずつを選び、薬剤感受性を測定したところ、全ての耐性変異株が doxycycline (MIC = 4  $\mu\text{g/ml}$ ) と minocycline (MIC = 2  $\mu\text{g/ml}$ ) に低度耐性を示した (Table 14)。一方、reserpine 添加による MIC を測定したが、非添加時との差は認められなかった (Table 14)。

耐性因子の解析を行ったところ、16S rRNA 遺伝子変異は認められなかった (Table 13)。一方、*rpsJ* 遺伝子変異は、全ての株で認められ、菌株によって異なるアミノ酸置換を生じる遺伝子変異が認められた。*rpsJ* 遺伝子変異による S10 protein のアミノ酸置換は、K57E が 8 株、K57M が 2 株、Y58D が 2 株で認められた。*rpsC* 遺伝子に変異は認められなかった。

## 【 考 察 】

テトラサイクリン系薬は、細菌の 30S rRNA のサブユニット 16S rRNA の A サイト h34 にコードされる aminoacyl-tRNA 部位に結合し、タンパク質合成を阻害する<sup>92, 93)</sup>。また、広い抗菌スペクトルを有し、細胞内移行性が高いため、様々な感染症に使用されている。感染症治療だけでなく、酒さなどに対し抗炎症作用を期待し、低用量で使用されることがある<sup>94)</sup>。痤瘡にも低用量で使用されており、テトラサイクリン系薬の副作用を低減させることができる<sup>95)</sup>。一方、耐性菌の出現を誘発するリスクがあるため、処方には注意を払う必要がある。そこで、本章では、*P. acnes* におけるテトラサイクリン耐性機構について研究した。

現在、*P. acnes* におけるテトラサイクリン耐性機構として、16S rRNA の G1036C 変異のみが報告されている<sup>62, 77)</sup>。本研究において、テトラサイクリン低感受性株では、*rpsJ* 遺伝子の変異による S10 protein のアミノ酸置換のみを認めた。そこで、本変異の耐性化への関与を明らかにするために、耐性変異株の作製を行った。その結果、doxycycline に低感受性を示す耐性変異株が得られ、これらの耐性変異株には *rpsJ* 遺伝子の変異による S10 protein のアミノ酸置換が認められた。加えて、耐性株から *rpsJ* 遺伝子の変異による S10 protein のアミノ酸置換と 16S rRNA の G1036C 変異を検出した。以上の結果は、*rpsJ* 遺伝子の変異による S10 protein のアミノ酸置換は、*P. acnes* のテトラサイクリン低感受性に関与することを明らかにし、S10 protein のアミノ酸置換に加え 16S rRNA 変異を獲得することでテトラサイクリン耐性することを示唆した。

Ribosomal S10 protein は 2 つの領域から成る構造体で、16S rRNA にリンクした細長いタンパク質である<sup>88)</sup>。S10 protein のアミノ酸置換は、*Neisseria gonorrhoeae* や *Bacillus subtilis* などテトラサイクリン耐性に関与すると報告されている (Fig. 9)<sup>88, 91)</sup>。*N. gonorrhoeae* では、テトラサイクリン系薬の結合部位近くに存在する 57 番目のアミノ酸に置換が認められ、構造もしくは極性の変化により、結合部位に影響を与えられている。一方、*B. subtilis* では、テトラサイクリン結合部位から遠い 46 番目のアミノ酸の置換が報告され、16S rRNA の h31、h34 の直近であることから、16S rRNA および S10 protein の構造的変化を誘発するものであると考えられている。本研究によって解明された *P. acnes* の S10 protein のアミノ酸置換は、57 または 58 番目のアミノ酸に認められ、*N. gonorrhoeae* に認められるアミノ酸置換と類似していると考えられる。一方、S3 protein をコードする *rpsC* 遺伝子における変異は、痤瘡患者由来株と作製した耐性変異株の両方で認められなかった。従って、*P. acnes* において S3 protein のアミノ酸置換は、テトラサイクリン耐性への関与が低いと考えられた。

S3 および S10 protein におけるアミノ酸置換は、グリシルサイクリン系薬の

<i>P. acnes</i>	1	VAGQKIRIRLRAYDHEVIDSSARKIVDTVTRTGAKVAGPV
<i>B. subtilis</i>	1	MAKQKIRIRLKAYDHRILDQSAEKIVETAKRSGASVSGPI
<i>N. gonorrhoeae</i>	1	MQTQKIRIRLKAYDYALIDRSAQEIVETAKRTGAVVKGP
<i>T. thermophilus</i>	1	MPKIRIKLRGFDHKTLDASAQKIVEAARRSGAQVSGPIPL
<i>P. acnes</i>	41	PLPTEKNVFCVIRSPHKYKDSREHFEMRTHKRLIDILEPT
<i>B. subtilis</i>	41	PLPTEKSVYTILLAVHKYKDSREQFEMRTHKRLIDIVNPT
<i>N. gonorrhoeae</i>	41	PLPTKIERFNILRSPHMNKTSREQLEIRTHLRLMDIVDWT
<i>T. thermophilus</i>	41	PTRVRRFTVIRGPFKHKDSREHFELRTHNRLVDIINPNRK
<i>P. acnes</i>	81	PKTVDSLMLRLDLPAGVDIEIKLP
<i>B. subtilis</i>	81	PQTVDALMRLDLPAGVDIEIKL
<i>N. gonorrhoeae</i>	81	DKTTDALMKLDLPAGVDVEIKVQ
<i>T. thermophilus</i>	81	TIEQLMTLDLPTGVEIEIKTVGGGR

Fig. 9. Homology of the ribosomal S10 proteins with *P. acnes*

*P. acnes*, *Propionibacterium acnes*; *B. subtilis*, *Bacillus subtilis*;  
*N. gonorrhoeae*, *Neisseria gonorrhoeae*; *T. thermophilus*,  
*Thermus thermophilus*.

tigecycline の感受性低下にも関与すると報告されていることから<sup>96,97)</sup>、*P. acnes* における S10 protein のアミノ酸置換の tigecycline 低感受性化への関与を明らかにするため、tigecycline の MIC を測定した。テトラサイクリン感受性株は tigecycline の MIC は 0.06 µg/ml 以下であったが、S10 protein のアミノ酸置換を有する痤瘡患者由来株と耐性変異株の両方は 0.25 ~ 0.5 µg/ml の MIC を示した (Table 13)。つまり、テトラサイクリン系薬と同様に、グリシルサイクリン系薬の tigecycline も S10 protein のアミノ酸置換により低感受性化することが示された。さらに、16S rRNA 遺伝子の変異および S10 protein のアミノ酸置換を有する耐性株では、MIC が 2 µg/ml とさらに上昇した。現在、tigecycline は痤瘡などの *P. acnes* が関連している疾患治療には使用されていない。しかしながら、S10 protein のアミノ酸置換を有することは、テトラサイクリン系およびグリシルサイクリン系薬に対して、多剤耐性化の要因となりえると示唆された。

16S rRNA 変異および S10 protein のアミノ酸置換を有する耐性株について調査すると、過去に 16S rRNA 変異株は doxycycline の MIC が 1 ~ 16 µg/ml、minocycline の MIC が 0.5 ~ 4 µg/ml を示したという報告がある<sup>59,77)</sup>。しかし、これらの株の S10 protein におけるアミノ酸置換の有無は解析されていない。本章では、16S rRNA 変異のみが検出された株はなく、16S rRNA 変異および S10 protein のアミノ酸置換を有していた株が 3 株認められ、doxycycline の MIC が 16 µg/ml、minocycline の MIC が 8 µg/ml であった。16S rRNA 変異および S10 protein のアミノ酸置換は、どちらも立体障害による薬剤結合親和性の低下であるため、相加効果により耐性化することが示唆される。つまり、報告されている 16S rRNA 変異株の中には、16S rRNA 変異のみを有する低感受

性株と 16S rRNA 変異および S10 protein のアミノ酸置換を有する耐性株が存在し、MIC に差があることが示唆された。

Fitz-Gibbon らは、*P. acnes* を 16S rRNA 遺伝子配列によってタイピングし、G1036C 変異株が特定の遺伝子型のクラスターを形成することを報告している<sup>27)</sup>。本章における遺伝学的解析でも、16S rRNA 遺伝子変異を有する耐性株は、SLST において C1 および C2 の近縁のタイプに分類された。つまり、16S rRNA 遺伝子変異を有する株が、*rpsJ* 遺伝子の変異による S10 protein のアミノ酸置換を獲得し、耐性株となると推測される。しかしながら、cluster C に分類される菌株の全てが 16S rRNA 遺伝子変異を有しているわけではなく、他の遺伝子型でも 16S rRNA 遺伝子変異株は認められる<sup>27)</sup>。第 1 章の研究で、MLS<sub>B</sub> 耐性株の伝播による流行が起きていないことを示し、皮膚常在菌である *P. acnes* の伝播も報告されていない。従って、cluster C に分類される菌株は、伝播によって流行したのではなく、16S rRNA 遺伝子変異を起こしやすい菌株である可能性が考えられる。*In vitro* における耐性変異株の作製では、1 段階目の変異として *rpsJ* 遺伝子の変異 (S10 protein のアミノ酸置換) を生じ、低感受性株となった。本研究では、16S rRNA 変異を有する耐性変異株を得ることはできなかったが、2 段階目の変異として 16S rRNA 遺伝子変異を生じ、耐性化することが強く示唆された。ヨーロッパでは 16S rRNA 変異株が流行していることから、cluster C に分類される菌株を用いた耐性変異株の作製、または臨床を模した抗菌薬の曝露試験を行うことにより高頻度に 16S rRNA 変異株を得られる可能性が考えられた。

第 2 章では、16S rRNA 遺伝子変異および *rpsJ* 遺伝子の変異による S10 protein のアミノ酸置換が *P. acnes* のテトラサイクリン耐性化に寄与することを明らかにし、これらの変異は段階的に獲得していることを示唆した。内服テトラサイクリン系薬による単剤治療であると、耐性変異株を出現させやすく、S10 protein のアミノ酸置換による低感受性化で、内服テトラサイクリン系薬が抗菌作用を示さない恐れがあるため、耐性株だけでなく、低感受性株の出現も抑制する必要がある。従って、内服テトラサイクリン系薬を処方する際は、外用抗菌薬や殺菌薬である benzoyl peroxide を併用すべきと考える。

## 第 3 章

### *P. acnes* における キノロン耐性機構の解析

## 【 緒 言 】

近年では、痤瘡患者からキノロン耐性 *P. acnes* も少数であるが報告されている<sup>57,68)</sup>。第1章で、本邦におけるキノロン耐性株の存在を明らかにした。諸外国では痤瘡治療のキノロン系薬をほとんど使用していないが、日本では外用薬と内服薬の両方が治療ガイドラインで推奨されている<sup>37)</sup>。そのため、本邦におけるキノロン耐性 *P. acnes* の更なる増加が危惧される。しかし、その耐性メカニズムは明らかとなっていない。

キノロン系薬は、DNA 酵素複合体に結合し、DNA 複製を阻害する<sup>98)</sup>。グラム陽性菌および陰性菌に広く認められるキノロン耐性機構として、標的部位である DNA gyrase および DNA topoisomerase IV のキノロン耐性決定領域 quinolone-resistance-determining region (QRDR) のコード部位での遺伝子変異に起因するアミノ酸置換により、結合親和性が低下し、耐性を生じることが知られている<sup>99)</sup>。DNA gyrase は GyrA、GyrB サブユニットから構成され、DNA topoisomerase IV も ParC、ParE サブユニットから構成される。また、QRDR におけるアミノ酸置換数によって段階的に耐性度が上昇し、特に GyrA および ParC に 2 つずつのアミノ酸置換を有する高度耐性株が知られている<sup>100)</sup>。キノロン系薬の種類にもよるが、大腸菌のようなグラム陰性菌においては GyrA が、黄色ブドウ球菌のようなグラム陽性菌では ParC が最も選択性の高い標的部位となる<sup>101,102)</sup>。他にも、薬物の排出による耐性化が知られており、黄色ブドウ球菌においてプラスミド性の排出ポンプがキノロン低感受性化に寄与することが知られている<sup>103)</sup>。グラム陰性菌においては、plasmid-mediated quinolones resistance (PMQR) gene として排出ポンプをコードする遺伝子や DNA gyrase を保護する遺伝子の獲得が知られている<sup>104)</sup>。

キノロン系薬は、痤瘡治療のみならず、呼吸器系など様々な感染症に使用されている。特に尿路感染症における汎用は、腸内細菌科細菌の耐性化を招いており、世界的な問題となっている<sup>105)</sup>。同様に、呼吸器感染症治療などでキノロン系薬が汎用されており、皮膚に常在するブドウ球菌属などの治療標的ではない細菌が耐性化する恐れがある。実際に、病院内からはキノロン高度耐性を示す methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) が頻繁に分離されている<sup>99,106)</sup>。従って、皮膚常在菌である *P. acnes* にも同様の影響が危惧される。そこで、本章では、本邦の痤瘡患者におけるキノロン耐性 *P. acnes* の現状を調査するために、痤瘡患者から分離された *P. acnes* のキノロン感受性を測定した。さらに、耐性メカニズムを解明するために、*in vitro* で耐性変異株を作製し、解析を行った。

## 【 方 法 】

### 1. 使用菌株

菌株は、第 1 章から追加した西嶋皮ふ科を受診した痤瘡患者由来の 211 株の *P. acnes* および、第 1 章と同様の東京女子医科大学病院を受診した痤瘡患者由来の 69 株の *P. acnes* を使用した。倫理的配慮は、第 1 章【方法】12 と同様に行い、実施された。薬剤感受性の測定には、薬剤感受性基準株として ATCC6919 株を使用した<sup>66)</sup>。DNA gyrase および DNA Topoisomerase IV をコードする遺伝子の wild type として、キノロン系薬に感受性で、全ゲノム配列が既知である ATCC11828 株 (Accession number: CP003084) を使用した。

### 2. *P. acnes* の遺伝学的分類法による解析

*P. acnes* の遺伝学的分類は、第 1 章【方法】8 に記した SLST で行った。

### 3. 薬剤感受性の測定

薬剤感受性は MIC を測定し、評価した。方法は、第 1 章【方法】3 に記した agar dilution procedure で行った。薬剤は、ciprofloxacin、levofloxacin、nadifloxacin、ozenoxacin (Maruho) を使用した。薬剤排出阻害による感受性変化の測定は第 2 章【方法】2 と同様の方法で行った。

### 4. 痤瘡患者由来株のキノロン耐性因子の解析

キノロン耐性因子を特定するために、DNA gyrase 遺伝子 (*gyrA* および *gyrB*) および Topoisomerase IV 遺伝子 (*parC* および *parE*) の QRDR 部位の DNA シーケンスを行った。使用したプライマーは Table 15 に示した。遺伝子の増幅には Tks Gflex<sup>®</sup> DNA Polymerase (Takara) を使用し、変性を 98°C で 10 sec、アニーリングを 60°C で 15 sec、伸長反応を 68°C で 1 min を 30 サイクル行い、増幅産物を得た。増幅したそれぞれの遺伝子産物は、第 1 章【方法】7 と同様の方法で DNA シーケンスにより配列を確認した。

## 5. キノロン耐性変異株の作製

変異耐性株の作製は、変法 GAM ブイヨンで 35°C、嫌気条件下で 48 hr 培養した ATCC11828 株を、 $10^{10}$  CFU/ml 程度となるように濃縮し、ciprofloxacin、levofloxacin および nadifloxacin を 2 倍濃度ごとに 0.5 ~ 32  $\mu$ g/ml 含んだ変法 GAM 寒天培地に 0.1 ml 塗布し、5 日間、35°C、嫌気条件下で培養を行い、増殖したコロニーを変異耐性株とした<sup>84)</sup>。また、増殖したコロニーをカウントし、3 回の試験の平均を耐性変異株出現頻度として算出した。コロニーの増殖が認められなくなった最小の薬剤濃度を耐性変異株出現阻止濃度 (MPC) とした。

## 6. 耐性変異株の増殖能の解析

ATCC11828 株および本株より得られた耐性変異株を使用し、液体培地における菌量を吸光度により測定し、増殖曲線を作成した。方法は、Ripio らの報告を参考に行った<sup>107)</sup>。菌株は、変法 GAM 寒天培地に培養した菌株を、変法 GAM ブイヨンに接種し、一晚培養した。Optical density (O.D.)<sub>600 nm</sub> = 1.0 程度まで増殖した培養液をそれぞれの濃度が O. D. = 0.001 となるように新しい液体培地 10 ml に接種した。培地は、35°C、嫌気条件下で培養を行い測定した。試験は 3 回行い、その平均を測定値とした。

Table 15. Oligonucleotide primers used for the analysis of quinolone resistance in *P. acnes*

Primer	Oligonucleotide Sequence (5' to 3')	Tm (°C)	Product size (bp)
gyrA-F	ATCGTTCATTTCAGCGC	49.3	2,854
gyrA-R1	CTTCTCGTGGGAAGGTACG	50.1	
gyrB-F	CGGTAGTATTGGATCGTTG	50.2	2,072
gyrB-R1	CGTCTTCAAGGGTCACCTG	55.2	
parC-F	GACAAGGTGCTCAACCAC	50.4	2,735
parC-R1	CTCCTCTAGCAGCCAGTC	49.2	
parE-F	AACACATTCCGTCACTAAGAC	50.5	2,367
parE-R1	CTGTCGATAAGCTGCCA	49.7	
gyrA-R <sup>a</sup>	CGATACCTGAAGAACCATTGAC	55.0	-
gyrB-F2 <sup>a</sup>	CACGAGGACTTCCTCTATAAG	49.8	-
gyrB-F3 <sup>a</sup>	GACTGGTTTCGAGGAGAATC	50.5	-
parE-F3 <sup>a</sup>	CATTAACGACCTTCTCCATAA	51.0	-
parE-F4 <sup>a</sup>	TCATACCACCGTTCTCGT	50.5	

<sup>a</sup>, sequencing primer



## 【 結 果 】

### 1. 座瘡患者由来株のキノロン感受性および耐性因子の解析

座瘡患者由来 280 株の *P. acnes* について、キノロン系薬の感受性を測定した。その結果、levofloxacin に MIC 8 ~ 16  $\mu\text{g/ml}$  を示すキノロン低感受性株が 8 株 (2.9%) 認められた (Table 16)。しかし、高度耐性株は認められなかった。7 株 (29b、75b、88a、169a、J-6、J-45、J-83b) は測定した 4 種のキノロン系薬に対して同様の感受性を示した。一方、121a 株は、他の 4 株に比べ、耐性レベルが低かった。

キノロン低感受性には、薬剤排出ポンプが関与している可能性がある<sup>103)</sup>。そこで、排出ポンプ阻害薬である reserpine 添加による MIC の変化を調査した。しかし、非添加時との違いは認められなかった。従って、*P. acnes* のキノロン耐性機構は薬剤の排出ではなく、薬剤標的部位の変異であることが示唆された。

そこで、DNA gyrase 遺伝子 (*gyrA* および *gyrB*) および DNA topoisomerase IV 遺伝子 (*parC* および *parE*) の塩基配列を解析し、QRDR のアミノ酸置換を解析した (Table 16)。キノロン系薬の MIC が類似していた 7 株の低感受性株で DNA gyrase を構成する GyrA における 101 番目のアミノ酸 (大腸菌 84 番目に相当) の serine から leucine への置換 (Ser101Leu) が認められた。異なる MIC を示した 121a 株では、GyrA における 105 番目のアミノ酸 (大腸菌 88 番目に相当) である aspartic acid から glycine への置換 (Asp105Gly) が認められた。一方、GyrB および ParC、ParE の QRDR には全ての株でアミノ酸置換は認められなかった。キノロン低感受性株の遺伝学的分類を SLST により行くと、121a および J-45 は A2、29b および 169a、J-6 は A5、J-83b は A10、75b は A24 に分類され、88a は決定することができなかった。

### 2. キノロン耐性変異株の作成

キノロン耐性機構を確認するために、3 種のキノロン系薬から *in vitro* で耐性変異株を作製した。キノロン耐性株は  $1.0 \times 10^{-10}$  ~  $2.7 \times 10^{-8}$  の頻度で得られた (Fig. 10)。それぞれの薬剤の 4  $\mu\text{g/ml}$  で増殖したコロニーを 8 株ずつ保存し、ciprofloxacin (CPFX4-1 ~ CPFX4-8)、levofloxacin (LVFX4-1 ~ LVFX4-8)、nadifloxacin (NDFX8-1 ~ NDFX8-8) 耐性変異株として以降の実験に使用した (Table 17)。耐性変異株は、全ての株でキノロン低感受性化が認められた。Ciprofloxacin で作製した 7 株 (CPFX4-1 ~ 4-7) および levofloxacin で作製した 8 株は、測定した 3 種のキノロン系薬に対して同等の耐性レベルを示した。CPFX4-8 は他の耐性変異株に比べて、耐性レベルは低かった。Nadifloxacin で作製した全ての耐性変異株は、ciprofloxacin と levofloxacin 変異株より

Table 16. GyrA substitution in low-level fluoroquinolone-resistant *P. acnes* isolated from patients with acne vulgaris

Strain	MIC (µg/ml)				Reserpine MIC (µg/ml)*			GyrA substitution
	CPFX	LVFX	NDFX	OZNX	CPFX	LVFX	NDFX	
29b	16	16	8	1	16	16	8	Ser101Leu
75b	16	16	8	1	16	16	8	Ser101Leu
88a	16	16	8	1	8	16	8	Ser101Leu
121a	16	8	4	0.5	8	8	4	Asp105Gly
169a	16	16	8	0.5	8	16	8	Ser101Leu
J-6	8	16	8	-	8	16	16	Ser101Leu
J-45	8	16	16	-	4	16	8	Ser101Leu
J-83b	16	16	8	-	8	16	8	Ser101Leu
ATCC11828	0.5	0.25	0.25	≤0.06	0.5	0.5	0.25	Wild

\*, MIC in the presence of reserpine

Five strains (29b ~ 169a) and three strains (J-6, J-45 and J-83b) were isolated in clinic and hospital, respectively.

CPFX, ciprofloxacin; LVFX, levofloxacin; NDFX, nadifloxacin; OZNX, ozenoxacin

-, not tested.

も levofloxacin の MIC が 32 µg/ml と高かった。Reserpine 添加による MIC の変化は認められなかった。QRDR の変異を解析すると、ciprofloxacin で選択された CPF4-8 を除く 7 株、levofloxacin で選択された 8 株において、GyrA における Ser101Leu のアミノ酸置換を生じる変異が認められた (Table 17)。一方、異なる感受性を示した CPF4-8 では GyrA における Asp105Gly のアミノ酸置換を生じる変異が認められた。Nadifloxacin で選択された 8 株は全て、GyrA における 101 番目の serine から tryptophan へのアミノ酸置換 (Ser101Trp) を起こす変異を有していた。いずれの耐性変異株においても、GyrB および ParC、ParE の QRDR にアミノ酸置換を生じる遺伝子変異は認められなかった。

加えて、異なるアミノ酸置換を有する LVFX4-1 (Ser101Leu)、CPF4-8 (Asp105Gly)、NDFX8-1 (Ser101Trp) を用いて、高度耐性変異株の分離を行った (Table 17)。LVFX4-1 からは、levofloxacin の選択により FQ-R1、FQ-R2 および FQ-R3 が得られた。それぞれの耐性変異株からは、GyrA の Ser101Leu に加えて GyrA の Asp105Gly、または GyrB における 476 番目の asparagine から glutamic acid (Asn476Glu) もしくは 495 番目の serine から proline (Ser495Pro) の 2 つのアミノ酸置換を生じる遺伝子変異が認められた。CPF4-8 からは、levofloxacin の選択により GyrA の Asp105Gly に加え、GyrA の Ser101Leu の 2 つのアミノ酸置換株を有する FQ-R4 が得られ、FQ-R1 と同一のアミノ酸置換を有し、同一の MIC を示した。一方、Ser101Trp を有する NDFX8-1 からは高度耐性変異株は得られなかった。これらの高度耐性変異株において DNA topoisomerase (ParC および ParE) の QRDR にアミノ酸置換を生じる遺伝子変異は認められなかった。また、2 アミノ酸置換株の levofloxacin、nadifloxacin および ozenoxacin の MIC は 1 アミノ酸置換株よりも上昇していた。一方、ciprofloxacin の MIC に変化は認められなかった。

Table 17. Quinolone susceptibilities and QRDR mutations in GyrA and GyrB for fluoroquinolone-resistant mutants

Resistant mutant*	MIC (µg/ml)				QRDR substitutions	
	Ciprofloxacin	Levofloxacin	Nadifloxacin	Ozenoxacin	GyrA	GyrB
1st selection						
CPFX4-1	16	16	8	0.5	Ser101Leu	-
CPFX4-8	16	4	1	0.13	Asp105Gly	-
LVFX4-1	16	16	8	0.5	Ser101Leu	-
NDFX8-1	16	32	8	0.5	Ser101Trp	-
2nd selection						
FQ-R1	16	64	32	4	Ser101Leu, Asp105Gly	-
FQ-R2	16	64	16	1	Ser101Leu	Asp476Glu
FQ-R3	16	64	32	4	Ser101Leu	Ser495Pro
FQ-R4	16	64	32	4	Ser101Leu, Asp105Gly	-
ATCC11828	0.5	0.25	0.25	≤0.06	-	-

\*, Strain no. exhibit the antimicrobial using the selection of resistant mutants. Strains named CPFX were selected by ciprofloxacin. In similar, strains named LVFX and NDFX were selected by levofloxacin and nadifloxacin, respectively. FQ-R1, R2, and R3 were selected by levofloxacin from LVFX4-1 as a parental strain. In the same way, FQ-R4 was selected by levofloxacin from CPFX4-8. -, no substitution was found.

### 3. 各種キノロン系薬における耐性変異株出現頻度

3種のキノロン系薬 ciprofloxacin、levofloxacin、nadifloxacin の *P. acnes* に対する耐性変異株出現頻度および耐性菌出現阻止濃度 (MPC) を測定した。その結果、ciprofloxacin および levofloxacin では 8 µg/ml まで耐性変異株が出現した (Fig. 10)。一方、nadifloxacin では 4 µg/ml まで出現が認められた。それぞれの頻度は、ciprofloxacin の濃度が 1 µg/ml のとき  $2.7 \times 10^{-8}$ 、2 µg/ml のとき  $1.2 \times 10^{-8}$ 、4 µg/ml のとき  $6.6 \times 10^{-10}$ 、8 µg/ml のとき  $1.0 \times 10^{-10}$  であった。Levofloxacin では、1 µg/ml のとき  $1.9 \times 10^{-8}$ 、2 µg/ml のとき  $7.3 \times 10^{-9}$ 、4 µg/ml のとき  $6.0 \times 10^{-9}$ 、8 µg/ml のとき  $2.5 \times 10^{-9}$  であった。Nadifloxacin では、1 µg/ml のとき  $8.0 \times 10^{-9}$ 、2 µg/ml のとき  $2.9 \times 10^{-9}$ 、4 µg/ml のとき  $3.5 \times 10^{-9}$ 、8 µg/ml のとき  $< 2.0 \times 10^{-10}$  を示した。以上より、いずれの濃度においても、nadifloxacin の変異頻度は ciprofloxacin および levofloxacin よりも低かった。また、他の薬剤と比較して nadifloxacin の耐性変異株出現頻度および MPC はいずれも低かった (Fig. 10 and Table 18)。一方、耐性菌選択領域 (MSW) は、ciprofloxacin は 32、levofloxacin は 64、nadifloxacin は 32 となり、違いは認められなかった。

### 4. キノロン耐性変異による増殖への影響

耐性変異株の環境への適応能を調査するために、親株である ATCC11828 と耐性変異株である LVFX4-1 (Ser101Leu)、CPF4-8 (Asp105Gly)、NDFX8-1 (Ser101Trp)、FQ-R1 (Ser101Leu and Asp105Gly) の液体培地中における各培養時間の菌量を測定し、比較した (Fig. 11)。その結果、すべての耐性変異株の増殖能は、親株である ATCC11828 よりも低かった。特に、NDFX8-1 (Ser101Trp) の増殖能は、親株よりも著しく低下していた (24 hr,  $P < 0.05$ )。耐性変異株の中では、LVFX4-1 (Ser101Leu) と CPF4-8 (Asp105Gly) は同等の増殖能が認められ、FQ-R1 (Ser101Leu and Asp105Gly) の増殖能は LVFX4-1 および CPF4-8 よりも低かった。以上より、*P. acnes* における DNA gyrase の変異は、増殖能を低下させ、また、アミノ酸置換の種類によって増殖能が異なることが示された。

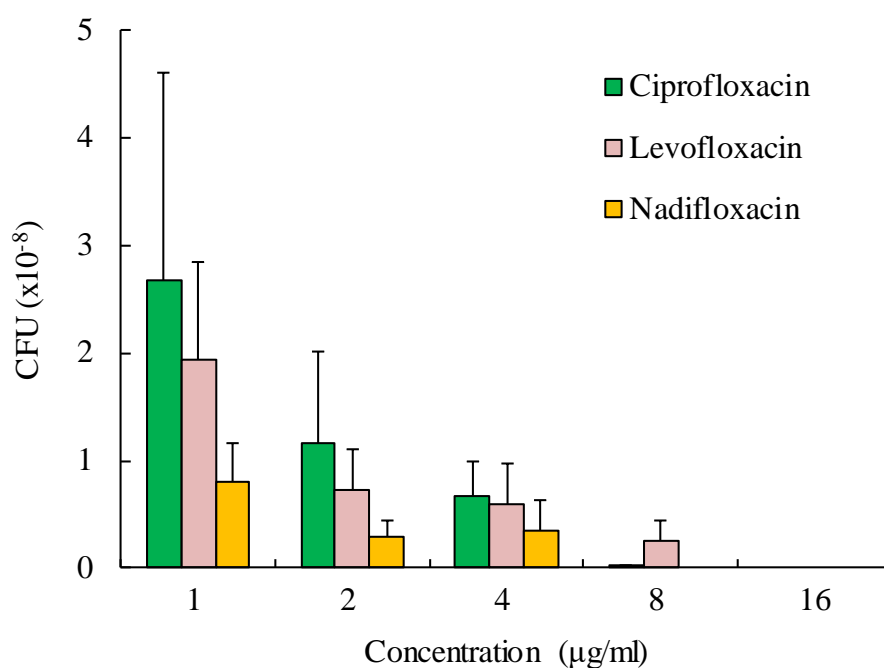


Fig. 10. Comparison of the mutation frequency in the presence of fluoroquinolone for *P. acnes* ATCC11828

For ciprofloxacin, the mutation frequencies were  $2.7 \times 10^{-8}$ ,  $1.2 \times 10^{-8}$ ,  $6.6 \times 10^{-10}$ , and  $1.0 \times 10^{-10}$  on the plates containing serial two-fold antimicrobial concentrations (1, 2, 4, and 8 µg/ml, respectively). For levofloxacin, the mutation frequencies were  $1.9 \times 10^{-8}$ ,  $7.3 \times 10^{-9}$ ,  $6.0 \times 10^{-9}$ , and  $2.5 \times 10^{-9}$  on the plates containing serial two-fold antimicrobial concentrations (1, 2, 4, and 8 µg/ml, respectively). For nadifloxacin, the mutation frequencies were  $8.0 \times 10^{-9}$ ,  $2.9 \times 10^{-9}$ ,  $3.5 \times 10^{-9}$ , and  $<1.0 \times 10^{-10}$  on the plates containing serial two-fold antimicrobial concentrations (1, 2, 4, and 8 µg/ml, respectively).

Table 18. Comparison of MIC, MPC, and MSW for fluoroquinolones in *P. acnes* ATCC11828

Antimicrobial agent	MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )	MPC ( $\mu\text{g/ml}$ )	MSW (MPC/MIC)
Ciprofloxacin	0.5	16	32
Levofloxacin	0.25	16	64
Nadifloxacin	0.25	8	32

MIC, minimum inhibitory concentration.

MPC, mutant prevention concentration.

MSW, mutant selection window.

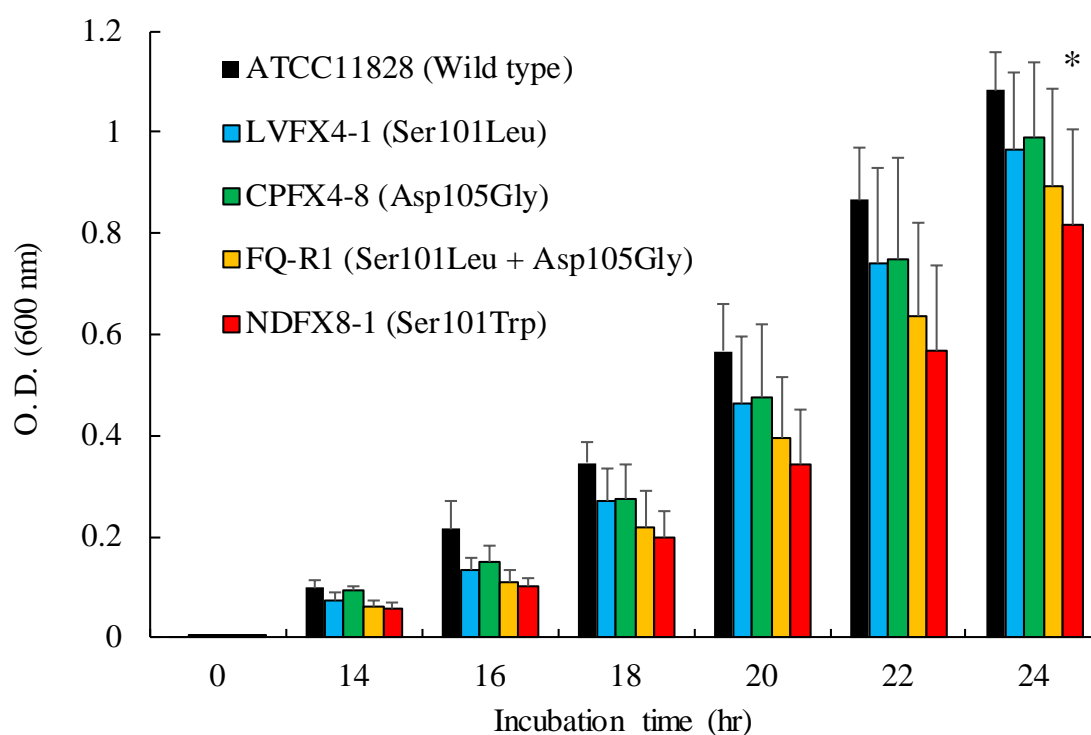


Fig. 11. Comparison of the growth rates for *P. acnes* ATCC11828 wild type strain and fluoroquinolones-resistant mutants

Asterisk showed that O.D. of ATCC11828 strain as bacterial concentration was significantly different from the other strains by Student's *t*-test ( $P < 0.05$ ).

## 【 考 察 】

キノロン耐性 *P. acnes* の分離は報告されているが、その耐性メカニズムは不明であった。*S. aureus* などのグラム陽性菌では、薬剤標的部位である DNA gyrase および DNA topoisomerase IV の変異が主な耐性機構として知られている。

そこで、痤瘡患者から分離されたキノロン低感受性 *P. acnes* において、DNA gyrase および DNA topoisomerase IV におけるアミノ酸置換の有無を調査した。その結果、DNA gyrase の A サブユニットである GyrA におけるアミノ酸置換が認められた。さらに、*in vivo* において耐性変異株を作製すると、ciprofloxacin または levofloxacin 選択ではキノロン低感受性を示した痤瘡患者由来株と同じアミノ酸置換である GyrA の Ser101Leu もしくは Asp105Gly を生じる遺伝子変異を有する耐性変異株が得られた。一方、nadifloxacin 選択では GyrA の Ser101Trp を生じる遺伝子変異を有する耐性変異株のみが得られた。以上より、選択されるキノロン系薬により、異なるアミノ酸置換を起こす遺伝子変異を生じることが示され、痤瘡患者由来株は内服薬である ciprofloxacin または levofloxacin の選択で得られた耐性変異株と同一のアミノ酸置換を有していた。

さらに、LVFX4-1 (Ser101Leu) を用いて高度耐性株の分離を行うと、levofloxacin の選択で GyrA または GyrB における 2 つ目のアミノ酸置換を有する耐性変異株が認められた。しかし、DNA topoisomerase IV (ParC および ParE) にアミノ酸置換を起こす遺伝子変異は認められなかった。Ciprofloxacin および levofloxacin は ParC に親和性が高い薬物であるにもかかわらず、DNA gyrase のみに変異が認められた<sup>108)</sup>。つまり、*P. acnes* において、キノロン系薬は DNA gyrase への選択性が高いことが示唆された。加えて、痤瘡患者由来株からは 2 アミノ酸置換株は見出されていないが、内服薬である levofloxacin の使用で出現する可能性が示唆されたことから、キノロン系薬の使用にはより注意を払わなければならないと考える。

耐性変異株のうち、最も高い MIC を示したのは GyrA の Ser101Trp を有する耐性変異株であり、Ser101Leu を有する株に比べ levofloxacin の MIC がより上昇していた。一方、GyrA の Asp105Gly を有する株は GyrA の Ser101 置換株に比べ levofloxacin および nadifloxacin の MIC が低かった。また、Asp105Gly 株は、痤瘡患者由来だけでなく、作製した耐性変異株においても検出頻度が低かった。その原因は不明であるが、第 1 段階の耐性変異として Ser101Leu を生じやすいと考えられる。つまり、GyrA において 101 番は 105 番におけるアミノ酸置換より、キノロン耐性化に大きく影響することが示された。

各キノロン系薬における耐性変異株出現頻度を測定すると、ciprofloxacin および



levofloxacin は nadifloxacin より各濃度において高い耐性変異株出現頻度を示した。増殖能について調査すると、nadifloxacin の選択により得られた GyrA の Ser101Trp を有する株は、親株や他の耐性変異株に比べ増殖が遅く、臨床でも分離されなかった。つまり、GyrA の Ser101Trp を有する株は、GyrA の Ser101Leu もしくは Asp105Gly を有する株に比べ、出現しにくく、増殖が遅いため淘汰されやすい株であることが示唆された。加えて、外用薬である nadifloxacin は、皮膚表面に直接塗布するため、その濃度はおよそ  $600\text{ }\mu\text{g}/\text{cm}^2$  になると推測され、変異耐性株が出現しにくいという推察が支持される。一方、内服薬の levofloxacin 200 mg を服用時の皮膚組織濃度は  $0.13 \sim 3.36\text{ }\mu\text{g}/\text{g}$  と報告されている<sup>109)</sup>。本研究では痤瘡患者の抗菌薬使用歴は調査できなかったため、薬剤による耐性化の影響を解析することはできなかったが、levofloxacin 服用時の皮膚濃度は MPC を下回ることから、内服薬の使用は耐性株出現のリスクが高いことが示唆された。

以上より、*P. acnes* のキノロン耐性化には、外用薬である nadifloxacin 使用による *P. acnes* 耐性株出現リスクは非常に低く、内服キノロン系薬の使用が大きく関与していることが強く示唆された。さらに、本研究結果は、不十分な外用薬の塗布や塗布忘れなどのコンプライアンスの低下は、薬物濃度を維持することができなくなり耐性菌が出現する恐れがあることを示している。キノロン耐性 *P. acnes* を出現・流行させないためには、安易な内服薬のみの処方をするのを避け、効果的な抗菌薬治療を理解させる十分な患者指導が必要であると考ええる。

## 【 総 括 】

本申請論文では、痤瘡の増悪因子となる *P. acnes* の薬剤感受性および薬剤耐性メカニズムについて詳細な解析を行った。

第 1 章では、皮膚科クリニックおよび大学病院を受診した痤瘡患者由来 *P. acnes* の薬剤感受性の調査を行い、痤瘡治療に最も使用されているマクロライド系薬の耐性機構を解析した。その結果、クリニックに比べ、大学病院由来株の方が、高い耐性率を示した。その原因として、重症患者の受診が多いことが挙げられ、罹患期間の長さや抗菌薬治療の有無が耐性菌の定着に影響を与えることが示唆された。

第 2 章では内服薬として繁用されているテトラサイクリン系薬の耐性機構について解析を行った。Doxycycline 低感受性株から新規の *rpsJ* 変異による ribosomal S10 protein のアミノ酸置換を見出し、*P. acnes* のテトラサイクリン耐性化は、S10 protein のアミノ酸置換に加え、16S rRNA 変異を有することで段階的に生じる可能性を示した。

第 3 章では、キノロン系薬の耐性機構について解析を行った。*P. acnes* のキノロン耐性化には DNA gyrase を構成する GyrA と GyrB のアミノ酸置換を生じる遺伝子変異が関与することを初めて明らかにした。また、内服で使用される ciprofloxacin や levofloxacin の選択で痤瘡患者由来株と同一のアミノ酸置換を有する耐性変異株が得られ、外用の nadifloxacin では異なるアミノ酸置換を有する耐性変異株が得られることを示した。さらに、耐性変異株出現頻度や耐性変異株の増殖解析から、内服キノロン系薬は耐性株を出現させるリスクが高いことを示した。

現在、日本における痤瘡治療は過渡期にあると考えられ、2008 年に adapalene、2015 年に benzoyl peroxide と新規の痤瘡治療薬が承認され、これらの薬剤と外用抗菌薬を併用することが炎症期の標準療法となっている。本研究より、*P. acnes* の耐性化には内服薬が大きく関与していることを示唆した。従って、耐性菌を出現・流行させないためには、安易な内服抗菌薬の単剤治療は避け、外用抗菌薬や殺菌薬である benzoyl peroxide を基本薬剤として、併用すべきである。また、使用方法が遵守できないことで外用抗菌薬であっても耐性化に関与する恐れがあることから、内服薬・外用薬問わず、患者への抗菌薬治療の指導をしっかりと行うことが *P. acnes* の耐性化防止および有効な治療を行うために最も重要ではないかと考えられる。

つまり、薬剤耐性 *P. acnes* を回避した痤瘡治療を行うためには、医師、薬剤師だけでなく、患者も含めた抗菌薬の適正使用が必要である。本研究は、適正な痤瘡治療のエビデンスとなる情報を示しており、これから発展していく痤瘡治療への一助となると考える。

## 【 謝 辞 】

本論文を作成するにあたり、終始御指導、御鞭撻を賜りました東京薬科大学病原微生物学教室 教授 野口 雅久 先生に深甚なる謝意を表します。

また、本研究を遂行するにあたり、終始御指導、御助言を頂きました東京薬科大学病原微生物学教室 講師 中南 秀将 先生、助教 輪島 丈明 先生に心から感謝致します。

学部学生時および博士前期課程におきまして、研究の御指導を頂きました東京薬科大学 学長 笹津 備規 先生に謝意を表します。

また、臨床検体の提供に御協力頂きました、西嶋皮膚科 西嶋 攝子 先生、東京女子医科大学病院皮膚科 教授 川島 眞 先生、准講師 竹中 祐子 先生、虎の門病院皮膚科 部長 林 伸和 先生に篤く感謝の意を表します。

最後に、実験を遂行するにあたり御協力を頂きました、有馬 未紗 氏、瓦井 亜理沙 氏、加藤 勇氣 氏、斎田 光 氏、佐久間 唯 氏、畑野 絢 氏、秋山 結衣 氏、石垣 友理 氏、福島 英恵 氏、岡本 悠平 氏、黒澤 遼子 氏、小澤 紘子 氏、翠川 廉 氏を始めとする東京薬科大学病原微生物学教室諸氏に心より御礼申し上げます。

## 【 参 考 文 献 】

- 1) Tally FP, Goldin BR, Jacobus NV, *et al. Infect Immun*, Superoxide dismutase in anaerobic bacteria of clinical significance. **16**, 20-5 (1977)
- 2) Douglas HC, Gunter SE. *J Bacteriol*, The taxonomic position of *Corynebacterium acnes*. **52**, 15-23 (1946)
- 3) Grice EA, Segre JA. *Nat Rev Microbiol*, The skin microbiome. **9**, 244-53 (2011)
- 4) McGinley KJ, Webster GF, Leyden JJ. *Appl Environ Microbiol*, Regional variations of cutaneous propionibacteria. **35**, 62-6 (1978)
- 5) Thierry A, Maillard MB, Bonnarme P, *et al. J Agric Food Chem*, The addition of *Propionibacterium freudenreichii* to Raclette cheese induces biochemical changes and enhances flavor development. **53**, 4157-65 (2005)
- 6) Butler-Wu SM, Sengupta DJ, Kittichotirat W, *et al. J Bacteriol*, Genome sequence of a novel species, *Propionibacterium humerusii*. **193**, 3678 (2011)
- 7) Christensen GJ, Bruggemann H. *Benef Microbes*, Bacterial skin commensals and their role as host guardians. **5**, 201-15 (2014)
- 8) McGinley KJ, Webster GF, Ruggieri MR, *et al. J Clin Microbiol*, Regional variations in density of cutaneous propionibacteria: correlation of *Propionibacterium acnes* populations with sebaceous secretion. **12**, 672-5 (1980)
- 9) Schimel AM, Miller D, Flynn HW, Jr. *Am J Ophthalmol*, Endophthalmitis isolates and antibiotic susceptibilities: a 10-year review of culture-proven cases. **156**, 50-2 e1 (2013)
- 10) Aubin GG, Portillo ME, Trampuz A, *et al. Med Mal Infect, Propionibacterium acnes*, an emerging pathogen: from acne to implant-infections, from phylotype to resistance. **44**, 241-50 (2014)
- 11) Davidsson S, Molling P, Rider JR, *et al. Infect Agent Cancer*, Erratum to: Frequency and typing of *Propionibacterium acnes* in prostate tissue obtained from men with and without prostate cancer. **11**, 36 (2016)
- 12) Jiang D, Huang X, Geng J, *et al. Oncotarget*, Pulmonary fibrosis in a mouse model of sarcoid granulomatosis induced by booster challenge with *Propionibacterium acnes*. **7**, 33703-14 (2016)
- 13) Omori M, Bito T, Yamada M, *et al. J Eur Acad Dermatol Venereol*, Systemic sarcoidosis with bone marrow involvement showing *Propionibacterium acnes* in the lymph nodes. **29**, 2059-60 (2015)
- 14) Yu Y, Champer J, Garban H, *et al. Br J Dermatol*, Typing of *Propionibacterium acnes*: a

- review of methods and comparative analysis. **172**, 1204-9 (2015)
- 15) Voss JG. *J Bacteriol*, Differentiation of two groups of *Corynebacterium acnes*. **101**, 392-7 (1970)
  - 16) Holmberg K, Forsum U. *Appl Microbiol*, Identification of *Actinomyces*, *Arachnia*, *Bacterionema*, *Rothia*, and *Propionibacterium* species by defined immunofluorescence. **25**, 834-43 (1973)
  - 17) Webster GF, Cummins CS. *J Clin Microbiol*, Use of bacteriophage typing to distinguish *Propionibacterium acne* types I and II. **7**, 84-90 (1978)
  - 18) McDowell A, Valanne S, Ramage G, *et al.* *J Clin Microbiol*, *Propionibacterium acnes* types I and II represent phylogenetically distinct groups. **43**, 326-34 (2005)
  - 19) McDowell A, Gao A, Barnard E, *et al.* *Microbiology*, A novel multilocus sequence typing scheme for the opportunistic pathogen *Propionibacterium acnes* and characterization of type I cell surface-associated antigens. **157**, 1990-2003 (2011)
  - 20) Tomida S, Nguyen L, Chiu BH, *et al.* *MBio*, Pan-genome and comparative genome analyses of *Propionibacterium acnes* reveal its genomic diversity in the healthy and diseased human skin microbiome. **4**, e00003-13 (2013)
  - 21) Barnard E, Nagy I, Hunyadkurti J, *et al.* *J Clin Microbiol*, Multiplex touchdown PCR for rapid typing of the opportunistic pathogen *Propionibacterium acnes*. **53**, 1149-55 (2015)
  - 22) McDowell A, Barnard E, Nagy I, *et al.* *PLoS One*, An expanded multilocus sequence typing scheme for *Propionibacterium acnes*: investigation of 'pathogenic', 'commensal' and antibiotic resistant strains. **7**, e41480 (2012)
  - 23) Kilian M, Scholz CF, Lomholt HB. *J Clin Microbiol*, Multilocus sequence typing and phylogenetic analysis of *Propionibacterium acnes*. **50**, 1158-65 (2012)
  - 24) McDowell A, Nagy I, Magyari M, *et al.* *PLoS One*, The opportunistic pathogen *Propionibacterium acnes*: insights into typing, human disease, clonal diversification and CAMP factor evolution. **8**, e70897 (2013)
  - 25) Scholz CF, Jensen A, Lomholt HB, *et al.* *PLoS One*, A novel high-resolution single locus sequence typing scheme for mixed populations of *Propionibacterium acnes in vivo*. **9**, e104199 (2014)
  - 26) Bruggemann H, Henne A, Hoster F, *et al.* *Science*, The complete genome sequence of *Propionibacterium acnes*, a commensal of human skin. **305**, 671-3 (2004)
  - 27) Fitz-Gibbon S, Tomida S, Chiu BH, *et al.* *J Invest Dermatol*, *Propionibacterium acnes* strain populations in the human skin microbiome associated with acne. **133**, 2152-60 (2013)
  - 28) Zappe B, Graf S, Ochsner PE, *et al.* *Arch Orthop Trauma Surg*, *Propionibacterium* spp.

- in prosthetic joint infections: a diagnostic challenge. **128**, 1039-46 (2008)
- 29) Clayton JJ, Baig W, Reynolds GW, *et al. J Med Microbiol*, Endocarditis caused by *Propionibacterium* species: a report of three cases and a review of clinical features and diagnostic difficulties. **55**, 981-7 (2006)
  - 30) Arnell K, Cesarini K, Lagerqvist-Widh A, *et al. J Neurosurg Pediatr*, Cerebrospinal fluid shunt infections in children over a 13-year period: anaerobic cultures and comparison of clinical signs of infection with *Propionibacterium acnes* and with other bacteria. **1**, 366-72 (2008)
  - 31) Perry A, Lambert P. *Expert Rev Anti Infect Ther*, *Propionibacterium acnes*: infection beyond the skin. **9**, 1149-56 (2011)
  - 32) Levy O, Iyer S, Atoun E, *et al. J Shoulder Elbow Surg*, *Propionibacterium acnes*: an underestimated etiology in the pathogenesis of osteoarthritis? **22**, 505-11 (2013)
  - 33) McDowell A, Patrick S, Eishi Y, *et al. Biomed Res Int*, *Propionibacterium acnes* in human health and disease. **2013**, 493564 (2013)
  - 34) Joseph T. DiPiro, Robert L. Talbert, Gary C. Yee, *et al.*, Pharmacotherapy: A Pathophysiologic Approach, 9th edition. (2014)
  - 35) 川島 眞, 赤松浩彦, 林 伸和, *et al. Rinsho Hifuka*, 皮膚科専門医療機関における痤瘡患者実態調査. **62**, 673-82 (2008)
  - 36) Hayashi N, Akamatsu H, Kawashima M, *et al. J Dermatol*, Establishment of grading criteria for acne severity. **35**, 255-60 (2008)
  - 37) Hayashi N, Akamatsu N, Iwatsuki K, *et al. Jpn J Dermatol*, A Acne Vulgaris Treatment Guideline 2016. **126**, 1045-86 (2016)
  - 38) Haider A, Shaw JC. *JAMA*, Treatment of acne vulgaris. **292**, 726-35 (2004)
  - 39) Oprica C, Lofmark S, Lund B, *et al. Anaerobe*, Genetic basis of resistance in *Propionibacterium acnes* strains isolated from diverse types of infection in different European countries. **11**, 137-43 (2005)
  - 40) Eady EA, Farmery MR, Ross JI, *et al. Br J Dermatol*, Effects of benzoyl peroxide and erythromycin alone and in combination against antibiotic-sensitive and -resistant skin bacteria from acne patients. **131**, 331-6 (1994)
  - 41) Nishijima S, Kurokawa I, Katoh N, *et al. J Dermatol*, The bacteriology of acne vulgaris and antimicrobial susceptibility of *Propionibacterium acnes* and *Staphylococcus epidermidis* isolated from acne lesions. **27**, 318-23 (2000)
  - 42) Kim SS, Kim JY, Lee NH, *et al. J Gen Appl Microbiol*, Antibacterial and anti-inflammatory effects of Jeju medicinal plants against acne-inducing bacteria. **54**, 101-6 (2008)

- 43) Nagy I, Pivarsci A, Kis K, *et al. Microbes Infect, Propionibacterium acnes* and lipopolysaccharide induce the expression of antimicrobial peptides and proinflammatory cytokines/chemokines in human sebocytes. **8**, 2195-205 (2006)
- 44) Akaza N, Akamatsu H, Numata S, *et al. J Dermatol*, Fatty acid compositions of triglycerides and free fatty acids in sebum depend on amount of triglycerides, and do not differ in presence or absence of acne vulgaris. **41**, 1069-76 (2014)
- 45) Iinuma K, Sato T, Akimoto N, *et al. J Invest Dermatol*, Involvement of *Propionibacterium acnes* in the augmentation of lipogenesis in hamster sebaceous glands *in vivo* and *in vitro*. **129**, 2113-9 (2009)
- 46) Jung YS, Matsumoto SE, Yamashita M, *et al. Biosci Biotechnol Biochem, Propionibacterium acnes* acts as an adjuvant in *in vitro* immunization of human peripheral blood mononuclear cells. **71**, 1963-9 (2007)
- 47) Webster GF. *J Am Acad Dermatol*, Inflammation in acne vulgaris. **33**, 247-53 (1995)
- 48) Burkhart CN, Gottwald L. *Skinmed*, Assessment of etiologic agents in acne pathogenesis. **2**, 222-8 (2003)
- 49) Jarrousse V, Castex-Rizzi N, Khammari A, *et al. Arch Dermatol Res*, Modulation of integrins and filaggrin expression by *Propionibacterium acnes* extracts on keratinocytes. **299**, 441-7 (2007)
- 50) Mallon E, Newton JN, Klassen A, *et al. Br J Dermatol*, The quality of life in acne: a comparison with general medical conditions using generic questionnaires. **140**, 672-6 (1999)
- 51) Chiu A, Chon SY, Kimball AB. *Arch Dermatol*, The response of skin disease to stress: changes in the severity of acne vulgaris as affected by examination stress. **139**, 897-900 (2003)
- 52) Holland DB, Jeremy AH, Roberts SG, *et al. Br J Dermatol*, Inflammation in acne scarring: a comparison of the responses in lesions from patients prone and not prone to scar. **150**, 72-81 (2004)
- 53) Hayashi N, Akamatsu N, Iwatsuki K, *et al. Jpn J Dermatol*, A Acne Vulgaris Treatment Guideline. **118**, 1893-923 (2008)
- 54) Amsden GW. *J Antimicrob Chemother*, Anti-inflammatory effects of macrolides--an underappreciated benefit in the treatment of community-acquired respiratory tract infections and chronic inflammatory pulmonary conditions? **55**, 10-21 (2005)
- 55) Piskin S, Uzunali E. *Ther Clin Risk Manag*, A review of the use of adapalene for the treatment of acne vulgaris. **3**, 621-4 (2007)
- 56) Tucher R. *Pharmaceutical Journal*, The role of benzoyl peroxide in the management of

- acne vulgaris. **279**, 48-53 (2007)
- 57) Sardana K, Gupta T, Garg VK, *et al. Expert Rev Anti Infect Ther*, Antibiotic resistance to *Propionibacterium acnes*: worldwide scenario, diagnosis and management. **13**, 883-96 (2015)
  - 58) Ross JI, Eady EA, Carnegie E, *et al. J Antimicrob Chemother*, Detection of transposon Tn5432-mediated macrolide-lincosamide-streptogramin B (MLSB) resistance in cutaneous propionibacteria from six European cities. **49**, 165-8 (2002)
  - 59) Ross JI, Snelling AM, Carnegie E, *et al. Br J Dermatol*, Antibiotic-resistant acne: lessons from Europe. **148**, 467-78 (2003)
  - 60) El-Mahdy TS, Abdalla S, El-Domany R, *et al. Anaerobe*, Detection of a new *erm(X)*-mediated antibiotic resistance in Egyptian cutaneous propionibacteria. **16**, 376-9 (2010)
  - 61) Heller S, Kellenberger L, Shapiro S. *Antimicrob Agents Chemother*, Antipropionibacterial activity of BAL19403, a novel macrolide antibiotic. **51**, 1956-61 (2007)
  - 62) Coates P, Vyakarnam S, Eady EA, *et al. Br J Dermatol*, Prevalence of antibiotic-resistant propionibacteria on the skin of acne patients: 10-year surveillance data and snapshot distribution study. **146**, 840-8 (2002)
  - 63) Bettoli V, Borghi A, Rossi R, *et al. Dermatology*, Antibiotic resistance of propionibacteria. Four years' experience of a large number of cases in Italy. **212**, 206-7 (2006)
  - 64) Tan HH, Tan AW, Barkham T, *et al. Br J Dermatol*, Community-based study of acne vulgaris in adolescents in Singapore. **157**, 547-51 (2007)
  - 65) Hassanzadeh P, Bahmani M, Mehrabani D. *Indian J Dermatol*, Bacterial resistance to antibiotics in acne vulgaris: an *in vitro* study. **53**, 122-4 (2008)
  - 66) Ishida N, Nakaminami H, Noguchi N, *et al. Microbiol Immunol*, Antimicrobial susceptibilities of *Propionibacterium acnes* isolated from patients with acne vulgaris. **52**, 621-4 (2008)
  - 67) Dumont-Wallon G, Moyse D, Blouin E, *et al. Int J Dermatol*, Bacterial resistance in French acne patients. **49**, 283-8 (2010)
  - 68) Gonzalez R, Welsh O, Ocampo J, *et al. Int J Dermatol*, *In vitro* antimicrobial susceptibility of *Propionibacterium acnes* isolated from acne patients in northern Mexico. **49**, 1003-7 (2010)
  - 69) Moon SH, Roh HS, Kim YH, *et al. J Dermatol*, Antibiotic resistance of microbial strains isolated from Korean acne patients. **39**, 833-7 (2012)
  - 70) Toyne H, Webber C, Collignon P, *et al. Australas J Dermatol*, *Propionibacterium acnes* (*P. acnes*) resistance and antibiotic use in patients attending Australian general practice. **53**, 106-11 (2012)



- 71) Luk NM, Hui M, Lee HC, *et al.* *J Eur Acad Dermatol Venereol*, Antibiotic-resistant *Propionibacterium acnes* among acne patients in a regional skin centre in Hong Kong. **27**, 31-6 (2013)
- 72) Abdel Fattah NS, Darwish YW. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, *In vitro* antibiotic susceptibility patterns of *Propionibacterium acnes* isolated from acne patients: an Egyptian university hospital-based study. **27**, 1546-51 (2013)
- 73) Schafer F, Fich F, Lam M, *et al.* *Int J Dermatol*, Antimicrobial susceptibility and genetic characteristics of *Propionibacterium acnes* isolated from patients with acne. **52**, 418-25 (2013)
- 74) Mendoza N, Hernandez PO, Tyring SK, *et al.* *Int J Dermatol*, Antimicrobial susceptibility of *Propionibacterium acnes* isolates from acne patients in Colombia. **52**, 688-92 (2013)
- 75) Ross JI, Eady EA, Cove JH, *et al.* *Antimicrob Agents Chemother*, Clinical resistance to erythromycin and clindamycin in cutaneous propionibacteria isolated from acne patients is associated with mutations in 23S rRNA. **41**, 1162-5 (1997)
- 76) Gutell RR, Larsen N, Woese CR. *Microbiol Rev*, Lessons from an evolving rRNA: 16S and 23S rRNA structures from a comparative perspective. **58**, 10-26 (1994)
- 77) Ross JI, Eady EA, Cove JH, *et al.* *Antimicrob Agents Chemother*, 16S rRNA mutation associated with tetracycline resistance in a gram-positive bacterium. **42**, 1702-5 (1998)
- 78) Asada Y, Nakai Y. *Hifuka Kiyō*, [Antibiotic sensitivity of *Corynebacterium acnes*]. **64**, 1-7 (1969)
- 79) Kurokawa I, Nishijima S, Kawabata S. *Eur J Dermatol*, Antimicrobial susceptibility of *Propionibacterium acnes* isolated from acne vulgaris. **9**, 25-8 (1999)
- 80) CLSI. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Test for Bacteria That Grow Aerobically; Approved standard. M07-A8., (2009)
- 81) CLSI. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Methods of Antimicrobial Susceptibility Testing of Anaerobic Bacteria-Eighth Edition; Approved Standard M11-A8. (2012)
- 82) Lomholt HB, Kilian M. *PLoS One*, Population genetic analysis of *Propionibacterium acnes* identifies a subpopulation and epidemic clones associated with acne. **5**, e12277 (2010)
- 83) Oprica C, Nord CE, Bacteria ESGoARiA. *Clin Microbiol Infect*, European surveillance study on the antibiotic susceptibility of *Propionibacterium acnes*. **11**, 204-13 (2005)
- 84) Iwaki M, Noguchi N, Nakaminami H, *et al.* *Yakugaku Zasshi*, [Antimicrobial activity and frequency of spontaneous gentamicin-resistant mutants in bacteria related skin infections]. **131**, 1653-9 (2011)

- 85) Muraki Y, Yagi T, Tsuji Y, *et al.* *J Glob Antimicrob Resist*, Japanese antimicrobial consumption surveillance: First report on oral and parenteral antimicrobial consumption in Japan (2009-2013). **7**, 19-23 (2016)
- 86) Miyazaki E, Ando M, Fukami T, *et al.* *Clin Rheumatol*, Minocycline for the treatment of sarcoidosis: is the mechanism of action immunomodulating or antimicrobial effect? **27**, 1195-7 (2008)
- 87) Trzcinski K, Cooper BS, Hryniewicz W, *et al.* *J Antimicrob Chemother*, Expression of resistance to tetracyclines in strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **45**, 763-70 (2000)
- 88) Hu M, Nandi S, Davies C, *et al.* *Antimicrob Agents Chemother*, High-level chromosomally mediated tetracycline resistance in *Neisseria gonorrhoeae* results from a point mutation in the *rpsJ* gene encoding ribosomal protein S10 in combination with the *mtrR* and *penB* resistance determinants. **49**, 4327-34 (2005)
- 89) Di Caprio R, Lembo S, Di Costanzo L, *et al.* *Mediators Inflamm*, Anti-inflammatory properties of low and high doxycycline doses: an *in vitro* study. **2015**, 329418 (2015)
- 90) Spigaglia P, Barbanti F, Mastrantonio P. *J Antimicrob Chemother*, Multidrug resistance in European *Clostridium difficile* clinical isolates. **66**, 2227-34 (2011)
- 91) Wei Y, Bechhofer DH. *J Bacteriol*, Tetracycline induces stabilization of mRNA in *Bacillus subtilis*. **184**, 889-94 (2002)
- 92) Bauer G, Berens C, Projan SJ, *et al.* *J Antimicrob Chemother*, Comparison of tetracycline and tigecycline binding to ribosomes mapped by dimethylsulphate and drug-directed Fe<sup>2+</sup> cleavage of 16S rRNA. **53**, 592-9 (2004)
- 93) Wimberly BT, Brodersen DE, Clemons WM, Jr., *et al.* *Nature*, Structure of the 30S ribosomal subunit. **407**, 327-39 (2000)
- 94) Del Rosso JQ. *J Drugs Dermatol*, Anti-inflammatory dose doxycycline in the treatment of rosacea. **8**, 664-8 (2009)
- 95) Skidmore R, Kovach R, Walker C, *et al.* *Arch Dermatol*, Effects of subantimicrobial-dose doxycycline in the treatment of moderate acne. **139**, 459-64 (2003)
- 96) Cattoir V, Isnard C, Cosquer T, *et al.* *Antimicrob Agents Chemother*, Genomic analysis of reduced susceptibility to tigecycline in *Enterococcus faecium*. **59**, 239-44 (2015)
- 97) Lupien A, Gingras H, Leprohon P, *et al.* *J Antimicrob Chemother*, Induced tigecycline resistance in *Streptococcus pneumoniae* mutants reveals mutations in ribosomal proteins and rRNA. **70**, 2973-80 (2015)
- 98) Shen LL, Mitscher LA, Sharma PN, *et al.* *Biochemistry*, Mechanism of inhibition of DNA gyrase by quinolone antibacterials: a cooperative drug--DNA binding model. **28**, 3886-94

- (1989)
- 99) Hooper DC. *Lancet Infect Dis*, Fluoroquinolone resistance among Gram-positive cocci. **2**, 530-8 (2002)
  - 100) Saenz Y, Zarazaga M, Brinas L, *et al.* *J Antimicrob Chemother*, Mutations in *gyrA* and *parC* genes in nalidixic acid-resistant *Escherichia coli* strains from food products, humans and animals. **51**, 1001-5 (2003)
  - 101) Yoshida H, Bogaki M, Nakamura M, *et al.* *Antimicrob Agents Chemother*, Quinolone resistance-determining region in the DNA gyrase *gyrB* gene of *Escherichia coli*. **35**, 1647-50 (1991)
  - 102) Nakaminami H, Sato-Nakaminami K, Noguchi N. *Int J Antimicrob Agents*, A novel GyrB mutation in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) confers a high level of resistance to third-generation quinolones. **43**, 478-9 (2014)
  - 103) Nakaminami H, Noguchi N, Sasatsu M. *Antimicrob Agents Chemother*, Fluoroquinolone efflux by the plasmid-mediated multidrug efflux pump QacB variant QacBIII in *Staphylococcus aureus*. **54**, 4107-11 (2010)
  - 104) Ma J, Zeng Z, Chen Z, *et al.* *Antimicrob Agents Chemother*, High prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants *qnr*, *aac(6')-Ib-cr*, and *qepA* among ceftiofur-resistant Enterobacteriaceae isolates from companion and food-producing animals. **53**, 519-24 (2009)
  - 105) Redgrave LS, Sutton SB, Webber MA, *et al.* *Trends Microbiol*, Fluoroquinolone resistance: mechanisms, impact on bacteria, and role in evolutionary success. **22**, 438-45 (2014)
  - 106) Noguchi N, Nakaminami H, Nishijima S, *et al.* *J Clin Microbiol*, Antimicrobial agent of susceptibilities and antiseptic resistance gene distribution among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from patients with impetigo and staphylococcal scalded skin syndrome. **44**, 2119-25 (2006)
  - 107) Ripio MT, Brehm K, Lara M, *et al.* *J Bacteriol*, Glucose-1-phosphate utilization by *Listeria monocytogenes* is PrfA dependent and coordinately expressed with virulence factors. **179**, 7174-80 (1997)
  - 108) Pestova E, Millichap JJ, Noskin GA, *et al.* *J Antimicrob Chemother*, Intracellular targets of moxifloxacin: a comparison with other fluoroquinolones. **45**, 583-90 (2000)
  - 109) Nakatani Y, Uchiyama K, Tanimura H. *Japanese Journal of Chemotherapy*, A clinical study on levofloxacin concentration in the skin on antibiotic prophylaxis for outpatient surgery. **50**, 223-6 (2002)

## 【 研究成果の掲載 】

本申請論文は以下の報告を中心にまとめた。

### 【第1章】

1. Keisuke Nakase, Hidemasa Nakaminami, Norihisa Noguchi, Setsuko Nishijima and Masanori Sasatsu. First report of high levels of clindamycin-resistant *Propionibacterium acnes* carrying *erm*(X) in Japanese patients with acne vulgaris, *Journal of Dermatology*, 39, 794–796 (2012)
2. Keisuke Nakase, Hidemasa Nakaminami, Yuko Takenaka, Nobukazu Hayashi, Makoto Kawashima and Norihisa Noguchi. Relationship between the severity of acne vulgaris and antimicrobial resistance of bacteria isolated from acne lesions in a hospital in Japan, *Journal of Medical Microbiology*, 63, 721–728 (2014)
3. Keisuke Nakase, Hidemasa Nakaminami, Yuko Takenaka, Nobukazu Hayashi, Makoto Kawashima and Norihisa Noguchi. A novel 23S rRNA mutation in *Propionibacterium acnes* confers resistance to 14-membered macrolides, *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 6, 160–161 (2016)
4. Keisuke Nakase, Hidemasa Nakaminami, Yuta Toda and Norihisa Noguchi. Determination of the Mutant Prevention Concentration and the Mutant Selection Window of Topical Antimicrobial Agents against *Propionibacterium acnes*, *Chemotherapy*, 62, 94-99 (2016)

### 【第2章】

5. Keisuke Nakase, Hidemasa Nakaminami, Yuko Takenaka, Nobukazu Hayashi, Makoto Kawashima and Norihisa Noguchi. *Propionibacterium acnes* is developing gradual increase in resistance to oral tetracyclines, *Journal of Medical Microbiology*, 66, 8-12 (2017)

### 【第3章】

6. Keisuke Nakase, Yui Sakuma, Hidemasa Nakaminami and Norihisa Noguchi. Emergence of fluoroquinolone-resistant *Propionibacterium acnes* caused by amino acid substitutions of DNA gyrase but not DNA topoisomerase IV, *Anaerobe*, 42, 166-171 (2016)